

Succinimid-Thioether in der Peptidligation

Methodenentwicklung und Strukturaufklärung

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie der Philipps Universität Marburg

vorgelegt von

M.Sc. Stefan Lenz

aus Fulda

Marburg/Lahn 2018

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität als Dissertation angenommen am: _____

Erstgutachter: Prof. Dr. Armin Geyer

Zweitgutachter: Prof. Dr. Eric Meggers

Tag der mündlichen Prüfung: 06.07.2018

Hochschulkennziffer: 1180

Der experimentelle Teil dieser Arbeit entstand in der Zeit vom November 2013 bis Oktober 2017 am Fachbereich Chemie der Philipps Universität Marburg.

Mein besonderer Dank gilt

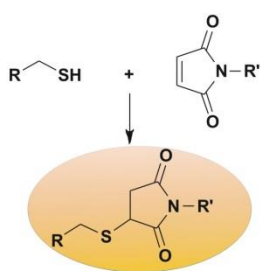
Prof. Dr. Armin Geyer

für die außerordentliche wissenschaftliche Freiheit und Unterstützung bei der Bearbeitung dieser komplexen und vielseitigen Thematik.

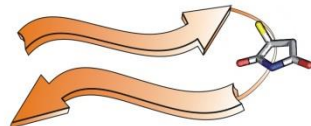
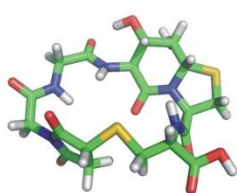
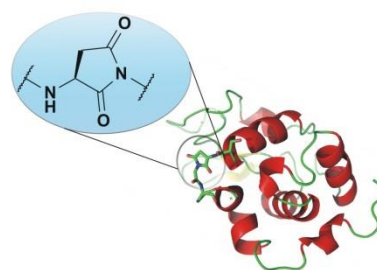
Kurzzusammenfassung

Die regioselektive Reaktion von Maleimiden mit einem Thiol unter Ausbildung eines Succinimid-Thioethers ist eine weit verbreitete Methode zur Konjugation von Biomolekülen oder zur Funktionalisierung von Oberflächen. Jedoch kommen hier ausschließlich flexible Linkermoleküle zum Einsatz. In dieser Arbeit wird die Anwendbarkeit dieser Methode erweitert und Succinimid-Thioether erstmals innerhalb des natürlich vorkommenden Peptidrückgratregisters ($-\text{NH}-\text{C}_\alpha-\text{CO}-$) bezüglich ihres konformationellen Einflusses auf die globale Struktur von Peptiden mit Hilfe der NMR-Spektroskopie hin untersucht. Durch die Betrachtung des Succinimid-Thioethers als isosteres Strukturmotiv zu Aspartimiden/Aminosuccinimiden, die durch posttranslationale Modifikationen (PTM) innerhalb von Proteinen natürlich vorkommen, wird eine Brücke zwischen der Biokonjugation und der chemischen Ligation von Peptiden und Proteinen geschlagen.

Thio-MICHAEL-Addition



Festphasensynthese/PTM



Die Erarbeitung von Synthesekonzepten zur Darstellung von Festphasensynthese-kompatiblen Maleimid-Dipeptidbausteinen sowie unnatürlichen β -Thioaminoacids zum Aufbau der isosteren Succinimid-Thioether lieferte dabei den Grundstein für Folgeexperimente an Peptiden. Durch die Synthese von makrozyklischen Hexapeptiden, β -hairpins und dem Foldon Miniprotein, die dieses Strukturmotiv beinhalten, konnte ein detaillierter Einblick in die Konformation sowie Parameter, die zur Ausbildung und Stabilisierung einer Sekundärstruktur notwendig sind,

erlangt werden. So konnte anhand von konformativ eingeschränkten, zyklischen Hexapeptide die Stereodynamik von Succinimid-Thioethern in Abhängigkeit der benachbarten Stereozentren nachgewiesen werden. Durch gezielte Mutation war es möglich diese Epimerisierungsreaktion in ihrer Geschwindigkeit zu steuern und sogar gänzlich zu unterdrücken. Weiterhin galt ein besonderes Interesse der Konformation des Succinimides als Teil eines β -turns. Zur Aufklärung diente dabei der isolierte β -hairpin des Foldons als Modellpeptid. Durch die Ligation zweier Einzelstränge konnten erfolgreich nativ faltende Foldon β -hairpins mit einem Succinimid in der $i+2$ -Position des β -turns synthetisiert werden. Die Analyse der NMR-spektroskopischen Daten zeigte, dass der Succinimid-Ring zusammen mit der Thioamino-säure die ungewöhnliche Konformation eines δ -turns an der $i+1$ - und $i+2$ -Position innerhalb des β -turns einnimmt. Bemerkenswert ist dabei die gesteigerte Faltungspopulation des β -hairpins im Vergleich zur nativen Sequenz. Untersuchungen innerhalb der Proteinumgebung des Foldons zeigten, dass Succinimid-Thioether durch gezielte Hydrolyse als pH-abhängige Schalter zur Ausbildung einer Quartärstruktur genutzt werden können.

Das hier beschriebene Konzept der isosteren Succinimid-Thioether innerhalb des Peptidrückgratregisters ist bis dato in der Literatur nicht bekannt. Daher liefert diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zur Eröffnung eines neuen Forschungsfeldes mit vielseitigen Fragestellungen.

Abstract

The reaction between maleimides and a thiol under formation of a succinimide-thioether is an well established method for bioconjugation and surface functionalization. So far, only flexible linker molecules have been investigated. In this work, succinimid-thioethers will be described within a peptide backbone under consideration of the native peptide backbone register (-NH-C α -CO-) for the first time. The conformational influence of the succinimide on the global structure of these peptides is investigated by NMR spectroscopy. The succinimide-thioether-motif as an isosteric replacement for aspartimides, which are a common posttranslational modification (PTM) on proteins, builds a bridge between bioconjugation and chemical ligation of proteins or peptides.

The developement of concepts for the synthesis of solidphase peptide synthesis-compatible maleimide building blocks as well as unnatural β -thioamino acids to build up isosteric succinimide-thioethers provides the basis for further investigations on peptides. The synthesis of macrocyclic hexapeptides, β -hairpins and the Foldon mini protein, containing such succinimide-thioethers, gave a detailed insight into conformational properties and parameters that are necessary for the stabilisation of secondary structures.

The constrained macrocyclic hexapeptides revealed a stereodynamic behaviour, wich was attributed to the enolisation of the succinimide ring. Further investigations showed that this epimerisation reaction can be controlled in its velocity or completely suppressed by changing or adding stereocenters at the N- or C-terminus of the succinimide ring. Furthermore there was an high interest in the conformation of the succinimide-thioether within a β -turn. To get insight into the turn geometry, Foldon β -hairpins have been investigated as model system by NMR spectroscopy, containing this motif at the $i+2$ position. The ligation of these hairpins was accomplished by the thio MICHAEL addition of two sepearate peptide strands, resulting in two separable diastereomers of the β -hairpin. Only one diastereomer has a native fold. It was shown that the succinimide ring together with the thioamino acid occupies an unique δ -turn at the $i+1$ and $i+2$ position within the intact β -turn of the Foldon β -hairpin. Remarkably, the folding population of the hairpin was increased by using *L-allo*-thiothreonine in comparison to the native Foldon hairpin. Further investigations of the Foldon mini protein showed that succinimide-thioethers can be systematicly hydrolised to serve as an pH-depended switch for the folding of quaternary structures.

The concept of using succinimide-thioethers as an isosteric replacement for aspartimides within a peptide backbone has been described for the first time in this work. It provides an important contribution to establish a new research area with versatile challenges.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Stefan Lenz, Philip Horx, Armin Geyer:

The stereodynamics of macrocyclic succinimid-thioethers

Journal of Peptide Science **2018**, e3075.

DOI: 10.1002/psc.3075

*Es gibt wichtigeres im Leben,
als beständig dessen Geschwindigkeit zu erhöhen.*

Mahatma Gandhi

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ligation	1
1.1.1 Native Chemische Ligation	1
1.2 MICHAEL-Additionreaktion und die Anwendung von Maleimiden in der Peptidchemie	8
1.2.1 MICHAEL-Additionsreaktion	8
1.2.2 Maleimide	13
1.3 Succinimide innerhalb von Peptiden und Proteinen	21
1.4 Strukturaufklärung von Peptiden mittels NMR-Spektroskopie	34
2. Aufgabenstellung und Motivation	41
3. Ergebnisse und Diskussion	43
3.1 Zyklische Hexapeptide mit Succinimid-Thioether innerhalb des Peptidrückgrates als Modell für β -hairpin Peptide	44
3.1.1 Synthese der Maleimid-Dipeptidbausteine	47
3.1.2 Synthese von Fmoc-L- <i>allo</i> -Thiotrityl-Threonin und Fmoc-L-Thiotrityl-Threonin	50
3.1.3 Synthese der zyklischen Hexapeptide	58
3.1.4 Konformationsanalyse der zyklischen Hexapeptide	60
3.1.5 Stereodynamik der zyklischen Hexapeptide	64
3.2 Methodenentwicklung zur allgemein gültigen Bestimmung der Faltungspopulation von β -hairpin-Peptiden	72
3.2.1 Foldon β -hairpins	72
3.2.2 Bestimmung der Faltungspopulation der isolierten Foldon β -hairpins	82
3.2.3 Anwendung auf komplexere Systeme	92
3.3 Succinimid-Thioether-Ligation	100
3.3.1 Ligation des isolierten Foldon β -hairpins	100
3.3.2 Ligation des Foldon-Miniproteins	148
3.4 Peptid epitope in der Diagnostik der rheumathoiden Arthritis	152
3.4.1 Die Succinimid-Thioether-Ligation zum Aufbau von Haptenen	157
3.5 Synthese eines funktionalisierbaren Foldon- β -hairpins	162
3.5.1 Vergleich von Foldon- β -hairpins mit Prolinderivaten an der <i>i</i> +2-Position des β -turns	163
3.5.2 Michael-Addition des 4(R)-Mercapto-L-prolin β -turn mit einem Maleimid-Tetrapeptid	165
3.5.3 Dimerbildung des Thp-Foldon β -hairpins	166
4. Zusammenfassung	171

5. Summary	174
6. Experimenteller Teil	177
6.1 Allgemeines	177
6.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften	180
6.3 Darstellung von Aminosäurederivaten	185
6.3.1 Darstellung von <i>N</i> -Fmoc- <i>S</i> -trityl- <i>L-allo</i> -Thiothreonin (Fmoc-Tht(Trt)-OH)	185
6.3.2 Darstellung von <i>N</i> -Fmoc- <i>S</i> -trityl- <i>L</i> -Thiothreonin (Fmoc-ThT(Trt)-OH)	199
6.3.3 Darstellung von <i>N</i> -Fmoc-(4 <i>S</i>)-thiotrityl- <i>L</i> -Prolin (Fmoc-ThP(Trt)-OH)	209
6.3.4 Darstellung von <i>N</i> -Fmoc-(4 <i>R</i>)-thiotrityl- <i>L</i> -Prolin (Fmoc-Thp(Trt)-OH)	219
6.3.5 Darstellung von <i>N</i> -Fmoc-Lysinthiol (Fmoc-Lst(Boc)-SH)	229
6.3.6 Darstellung von <i>N</i> -Fmoc-Asparaginthiol (Fmoc-Ant(Trt)-SH)	237
6.3.7 Darstellung von <i>N</i> -Fmoc-Citrullinthiol (Fmoc-Cis-SH)	245
6.4 Darstellung der Maleimid-Peptidbausteine	255
6.4.1 Darstellung von Mal=Gly	255
6.4.2 Darstellung von PG-Mal=Gly	257
6.4.3 Darstellung von Mal=phe	259
6.4.4 Darstellung von PG-Mal=phe	261
6.4.5 Darstellung von Mal=Phe	263
6.4.6 Darstellung von Mal=ala	265
6.4.7 Darstellung von PG-Mal=ala	267
6.4.8 Darstellung von Mal=Glu(OTES)-OH	269
6.5 Festphasensynthese linearen Vorläuferpeptide für die STL	281
6.6 Synthese der zyklischen Hexapeptide	315
6.7 Festphasensynthese der isolierten β -hairpin Peptide des Foldons	335
6.8 Ligation der isolierten β -hairpin Peptide des Foldons	359
6.9 Ligation des Foldons	397
6.10 Festphasensynthese der Pin1 WW Domäne	399
7. Literaturverzeichnis	404
8. Anhang	416
9. Danksagung	425

Abkürzungsverzeichniss

2-CTC	2-Chlortritylchlorid
Å	Ångström
abs.	absolut
Asu	Aminosuccinimid
aq.	Wässrig
Boc	Tertiärbutyloxycarbonyl
Bn	Benzyl
c	Konzentration
C	Celsius
d	Dublett (NMR), Tage
δ	chemische Verschiebung
DC	Dünnschichtchromatographie
DCE	Dichlorethan
DCM	Dichlormethan
dd	Doppeldublett (NMR)
ddd	doppeltes Dublett vom Dublett
DIC	N,N'-Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	Diisopropylethylamid
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DME	Dimethoxyethan
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMS	Dimethylsulfat
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimethylsulfoxid deuteriert
DQF-COSY	<i>Double Quantum Filtered Correlatet Spectroscopy</i>
EDCI	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
eq.	Äquivalent
ESI	Elektrosprayionisation
<i>et. al.</i>	und andere (aus dem lateinischen et alii, et aliae)
Fmoc	9-Fluorenylmethyloxycarbonyloxy
g	Gramm
h	Stunde
HBTU	O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'
	Tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>

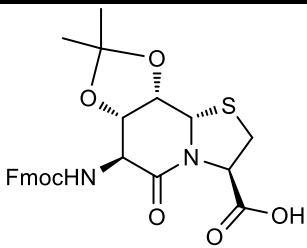
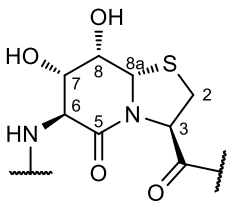
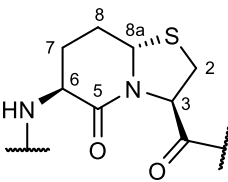
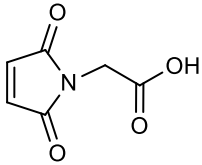
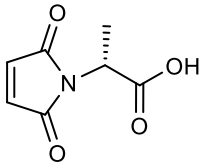
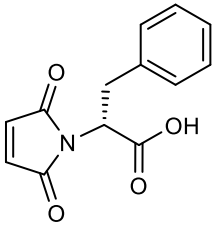
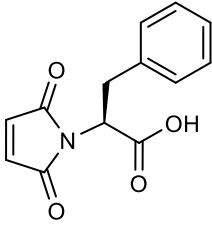
HMDS	1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HR-MS	hochauflösende Massenspektrometrie
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
HOAc	Essigsäure
HV	Hochvakuum
Hz	Hertz in s ⁻¹
<i>J</i>	Spin Spin Kopplung
K	Kelvin
L	Liter
LC/MS	<i>(High Pressure) Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy</i>
m	Multiplett (NMR)
mM	Millimol/L
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
mL	Milliliter
mmol	Millimol
mol	Mol
μmol	Mikromol
MS	Massenspektrometrie
NCL	<i>Native Chemical Ligation</i>
NMM	<i>N</i> -Methylmorpholin
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>
Ph	Phenyl
ppm	<i>Parts per million</i> (NMR)
q	quartet (NMR)
ROESY	<i>Rotating Frame Overhauser Effect Spectroscopy</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett (NMR)
Σ	Succinimid
SPPS	<i>Solid Phase Peptide Synthesis</i>
Suc	Succinimid

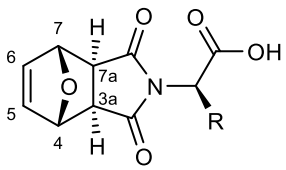
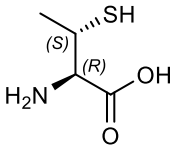
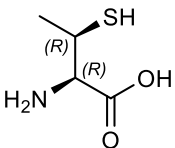
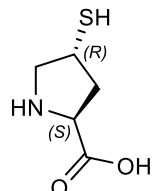
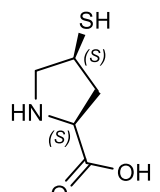
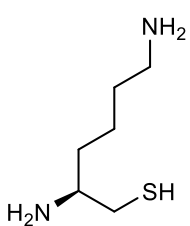
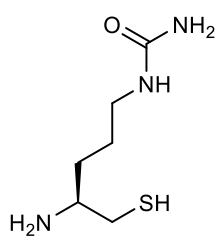
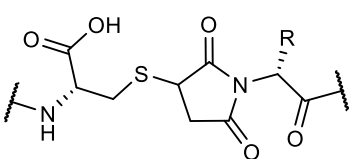
t	Triplett (NMR)
T	Temperatur
TBAF	Tetrabutylammoniumfluorid
^t Bu	tert-Butyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
TIPS	Triisopropylsilan
TMSCl	Chlortrimethylsilan
TMSE	2-(Trimethylsilyl)ethanol
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
Trt	Trityl

Abkürzung von verwendeten Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
L-Alanin/D-Alanin	Ala/ala	A/a
L-Argenin	Arg	R
L-Asparagin	Asn	N
L-Asparaginsäure	Asp	D
L-Citrullin/D-Citrullin	Cit/cit	-
L-Cystein/L-Cystein	Cys/cys	C/c
L-Glutamin	Gln	Q
L-Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
(4R)- L-Hydroxyprolin	Hyp	U
L-Isoleucin	Ile	I
L-Leucin	Leu	L
L-Lysin	Lys	K
L-Methionin	Met	M
L-Phenylalanin/ D-Phenylalanin	Phe/phe	F/f
L-Prolin	Pro	P
L-Serin	Ser	S
L-Tryptophan	Trp	W
L-Tyrosin	Tyr	T
L-Valin	Val	V

Abkürzung und Struktur verwendeter Dipeptidbausteine sowie unnatürlicher Aminosäuren

Struktur	Abkürzung
	Fmoc-Hot=Tap-OH
	Hot=Tap
	BTD
	Mal=Gly
	Mal=ala
	Mal=phe
	Mal=Phe

Struktur	Abkürzung
	PG-Mal=Xaa
	Tht
	ThT
	Thp
	ThP
	Lst
	Cis
	-Cys-Suc=Xaa-

1. Einleitung

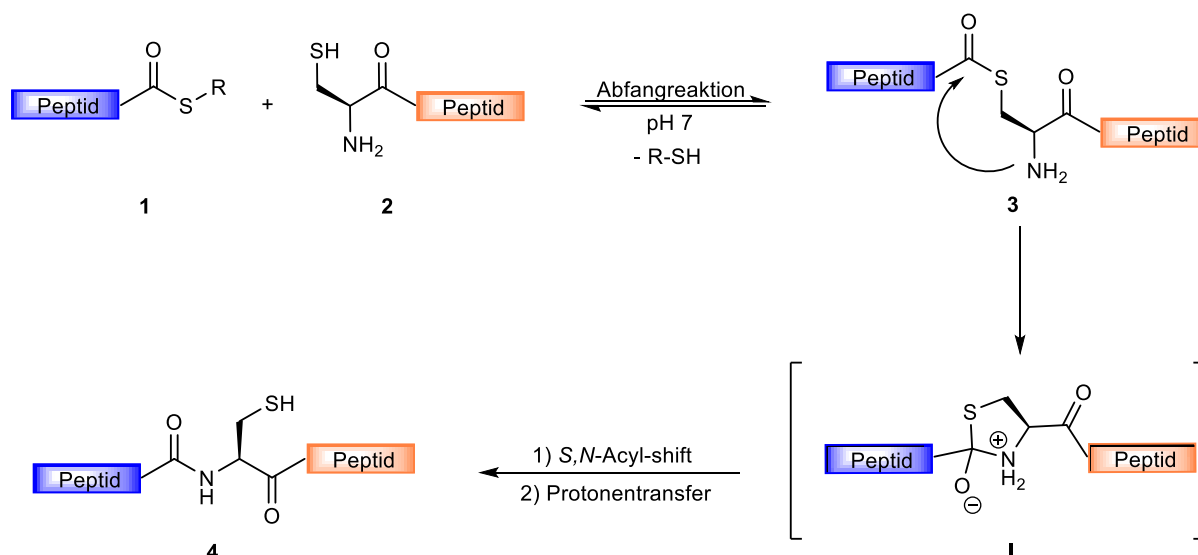
1.1 Ligation

Der Begriff Ligation kommt ursprünglich aus der Biochemie und steht dort für die Verknüpfung (*lat.*: *ligatio*) zweier Nukleinsäuremoleküle durch ein Enzym aus der Enzymklasse der Ligasen. DNA-Ligasen verknüpfen dabei eine freie 5'-Phosphat-Gruppe eines DNA-Doppelstrangs mit einer freien 3'-OH-Gruppe eines anderen oder des gleichen DNA-Strangs. Die Energie für diesen Prozess liefert die Hydrolyse von ATP.^[1] Anfang der 1990er Jahre wurde der Begriff der Ligation von KENT *et al.* auf die chemische Totalsynthese von Peptiden und Proteinen erweitert.^[2,3]

Die chemische Totalsynthese von Polypeptiden und insbesondere von Proteinen wird dabei üblicherweise durch das Zusammenfügen ungeschützter oder teilgeschützter Peptidfragmente durch Ausbildung einer nativen Amidbindung realisiert. Die Reaktion, in der die Amidbindung ausgebildet wird, muss den Anspruch einer hohen Chemo- oder Regioselektivität aufweisen und vorzugsweise im wässrigen Milieu bei einem pH-Wert von 7 durchführbar sein. Da die meisten Peptide mit zunehmender Größe oft eine schlechte Löslichkeit aufweisen, müssen die amidbildenden Reaktionen auch bei millimolaren Konzentrationen eine hohe Effizienz aufweisen. Fast alle heute bekannten und in der Synthese etablierten Ligationsmethoden verlaufen über eine chemoselektive Abfangreaktion wodurch der C- und N-Term der jeweiligen Peptidfragmente in einen geringen Abstand voneinander gebracht werden und dann in einer spontanen, intramolekularen Umlagerungsreaktion die native Amidbindung zwischen den Fragmenten ausgebildet wird.^[4] Die heutzutage dominierende Methode in der Totalsynthese von Proteinen ist die Native Chemische Ligation (*engl.*: *Native Chemical Ligation*; NCL).

1.1.1 Native Chemische Ligation

Die NCL wurde 1992 das erste Mal von KENT *et al.* beschrieben.^[2] Das zu Grunde liegende Konzept hierfür wurde jedoch schon in den 1950er Jahren durch BRENNER *et al.* und WIELAND *et al.* entwickelt.^[5,6] Die NCL beruht auf der Reaktion eines C-terminalen Peptid-Thioesters **1** mit einem N-terminalen Cystein-Peptid **2**. Im ersten Reaktionsschritt, der Abfangreaktion, wird ein Thioester-verknüpftes Intermediat **3** durch eine Thiol-Thioester-Umesterung ausgebildet. Durch einen spontanen *S,N*-Acyl-*shift*, der über einen fünfgliedrigen Übergangszustand **I** verläuft, wird dann die native Amidbindung **4** zwischen den Fragmenten ausgebildet (s. Schema 1).^[7]

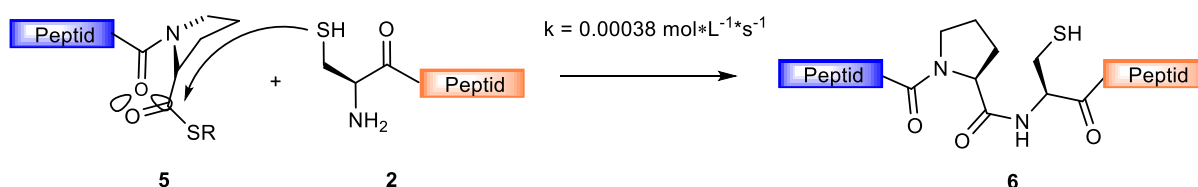


Schema 1: Mechanismus der *Native Chemical Ligation*, R = Alkyl, Ar. Durch eine Thiol-Thioester-Umesterung zwischen **1** und **2** wird das Thioester-verknüpftes Intermediat **3** ausgebildet, welches durch einen spontanen *S,N*-Acyl-shift, der über einen fünfgliedrigen Übergangszustand **I** verläuft die native Amidbindung **4** zwischen den Fragmenten ausgebildet.^[7]

Die Effizienz des Thiol-Thioester-Austausches während der Abfangreaktion in der NCL hängt stark von den Eigenschaften des Thioesters ab, der mit dem Cystein-Thiol reagiert. Arbeiten von JENCKS *et al.* zeigen, dass es für leicht basische Thiole, wie dem angreifendem Cystein-Thiol (pK_s 8.3), einen linearen Zusammenhang zwischen der Thiol-Thioester-Austauschrate und dem pK_s -Wert des freigesetzten Thiols gibt.^[8] Der Thiol-Thioester-Austausch läuft signifikant schneller ab wenn Thioester eingesetzt werden, die aus leicht aziden Thiolen wie Arylthiolen dargestellt wurden. Dennoch werden in der Synthese häufig die etwas schlechteren Alkylthioester als Startbaustein für die Proteinsynthese eingesetzt, da sie aufgrund ihrer höheren Stabilität deutlich leichter zu handhaben sind. Um die geringe Reaktivität der Alkylthioester zu umgehen wird während der NCL ein Überschuss an leicht aziden Thiolen wie Thiophenol (pK_s 6.6) oder 4-(Carboxymethyl)-Thiophenol (pK_s 6.6) eingesetzt, um *in situ* durch eine Thiol-Thioester-Umesterung den Arylthioester zu bilden.^[9,10] Nachdem dieser gebildet ist, reagiert er sofort mit dem Cystein-Peptid ab, wodurch sich der Arylthioester nie in der Reaktionslösung anreichert. Die Reaktionsrate des Cystein-Peptides in der NCL ist somit durch die Thiol-Thioester-Austauschrate zwischen Alkylthioester und dem Arylthiol-Katalysator limitiert.

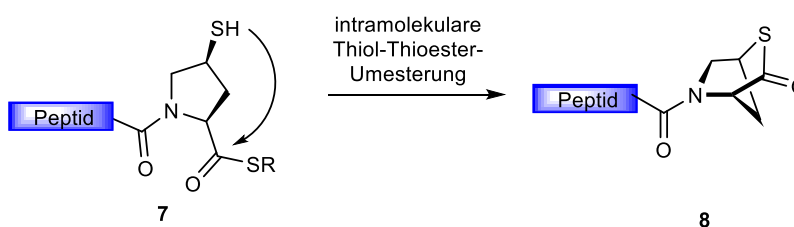
Ein weiterer limitierender Faktor ist der sterische Anspruch der Thioester-Einheit. Sterisch anspruchsvolle Seitenketten, vor allem von β -verzweigten Aminosäuren wie Isoleucin, Valin oder Threonin behindern die Annäherung der Thioestereinheit bei dem Angriff an Arylthiol.^[11]

Auch bei der Ligation zwischen einem C-terminalen Prolin-Thioester **5** und einem Cystein-Peptid **2** konnte ein drastischer Einbruch der Reaktionsgeschwindigkeit beobachtet werden (s. Schema 2). Obwohl Prolin keine β -verzweigten Aminosäure ist, wurde 2011 in einer systematischen Studie von KENT *et al.* eine um den Faktor 200 langsamere Reaktion im Vergleich zu einem Alanin-Thioester festgestellt. Prolin ist mit einer Geschwindigkeitskonstante von $k = 0.00038 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$, die am langsamsten reagierende natürliche Aminosäure in der NCL.^[12] Grund für diese herabgesetzte Elektrophilie des Prolin-Thioesters ist die $n \rightarrow \pi^*$ Orbitalwechselwirkung und sterische Hinderung des Amid-Carbonyls des Prolins (s. Schema 2). In einer *trans*-Konfiguration der Amidbindung wird das Sauerstoffatom des Carbonyls der Amidbindung durch das Puckering des Prolins in einen geringen Abstand zum Carbonyl-Kohlenstoffatom des Thioesters gebracht, wodurch die $n \rightarrow \pi^*$ Orbitalwechselwirkung die Elektronendichte des Thioester-Carbonylkohlenstoffs erhöht und somit die Elektrophilie senkt.^[13–15]



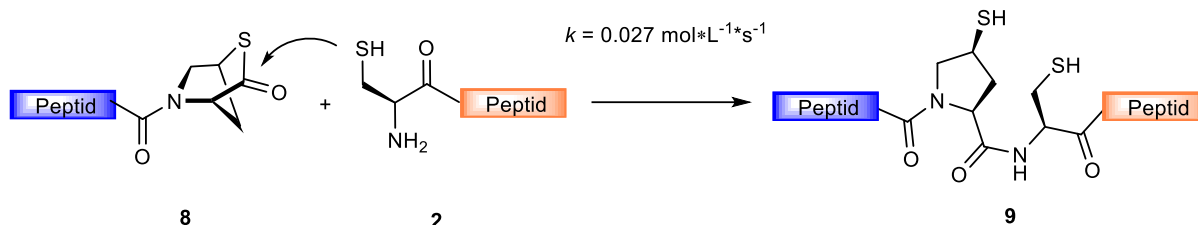
Schema 2: Native Chemische Ligation eines Prolin-Thioesters **5** mit einem Cystein-Peptid **2** führt zu einem drastischen Einbruch der Geschwindigkeitskonstante. Sie liegt um den Faktor 200 niedriger im Vergleich zu Alanin-Thioestern. Grund hierfür sind die $n \rightarrow \pi^*$ Orbitalwechselwirkung und sterische Hinderung des Amid-Carbonyl-Sauerstoffatoms des Prolins, die zu einer Erniedrigung der Elektrophilie des Thioester-Carbonylkohlenstoffs führen.^[13,15,16]

Arbeiten von DONG *et al.* konnten durch die Verwendung von 4-Mercapto-L-prolin-Thioestern **7** die Geschwindigkeitskonstante um den Faktor 70 auf $k = 0.027 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ steigern. Grund für die gesteigerte Reaktivität gegenüber dem normalen Prolin ist eine intramolekulare Thiol-Thioester-Umesterung hin zu einem Thiolakton **8** (s. Schema 3).



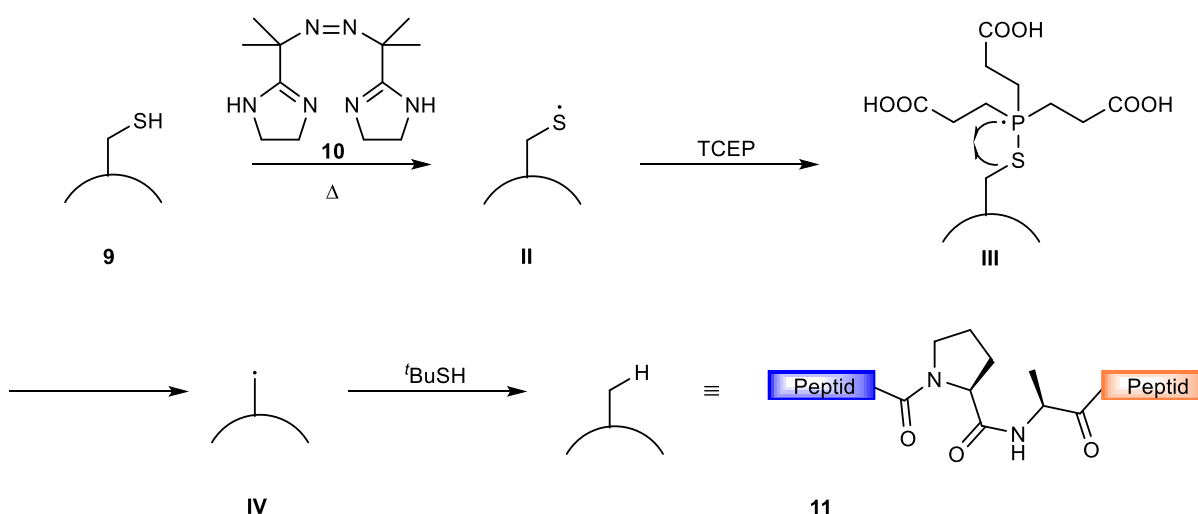
Schema 3: Intramolekulare Thiol-Thioester-Umesterung des 4-Mercaptoprolin-Thioester-Peptides **7** unter Ausbildung des Thiolaktone **8**. Durch die bicyklische Struktur des Thiolaktone **8** wird eine negative Beeinflussung der Elektrophilie des Thioester-Carbonylkohlenstoffs durch eine $n \rightarrow \pi^*$ Orbitalwechselwirkung vermieden.^[13]

Durch die bitykliche Struktur des Thiolaktone **8** wird eine negative Beeinflussung der Elektrophilie des Thioester-Carbonylkohlenstoffs durch eine $n \rightarrow \pi^*$ Orbitalwechselwirkung vermieden. Weiterhin wird durch die hohe Ringspannung ein nukleophiler Angriff des Cystein-Thiols **2** begünstigt. Nach der Ligation, die nach dem im Schema 1 gezeigten Mechanismus abläuft, bleibt das Mercaptoprolin-Cystein-Motiv **9** an der Ligationstelle erhalten (s. Schema 4).^[13]



Schema 4: Durch die hohe Ringspannung des intermediär gebildeten Thiolaktone **8** wird ein nukleophiler Angriff des Cystein-Thiols **2** begünstigt. Nach dem nukleophilen Angriff verläuft die Ligation nach dem im Schema 1 gezeigten Mechanismus unter Ausbildung des Mercaptoprolin-Cystein-Motivs **9**.^[13]

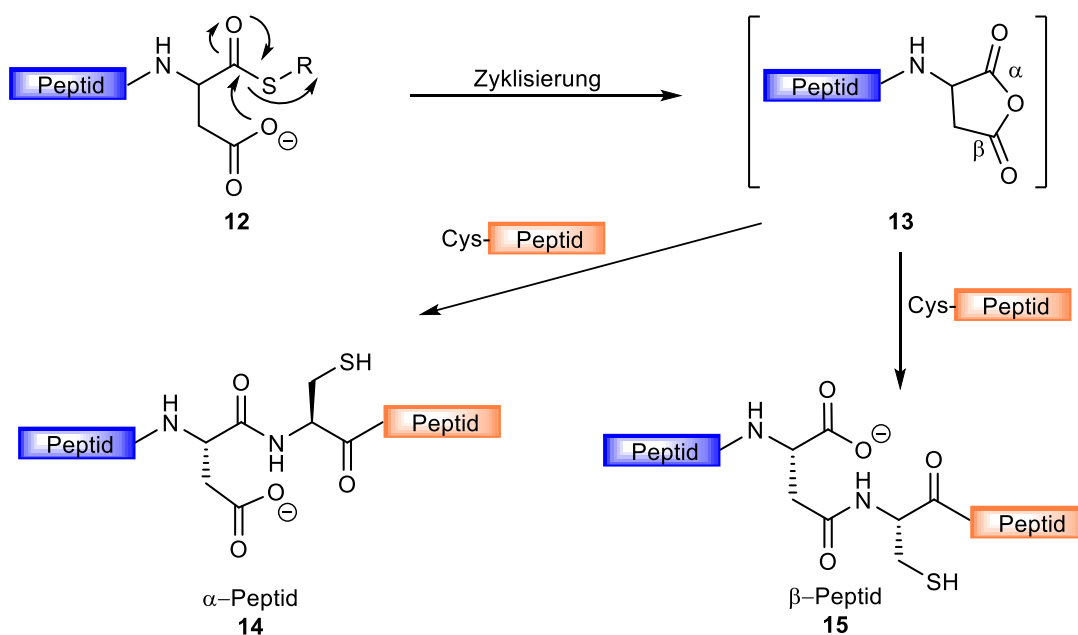
Um die Bildung von Disulfiden während der NCL zu verhindern wird meist tris(2-Carboxyethyl)-Phosphin (TCEP) zugegeben, welches ein starkes Reduktionsmittel für Disulfidbindungen ist. Es findet Anwendung in der metallfreien Desulfurierungs-Strategie (MFD) um das zwangsläufig an der Ligationstelle vorhandene Cystein in einer posttranslationalen Modifikation in Alanin umzuwandeln (s. Schema 5).^[17] Weiterhin wurden in den letzten Jahren von PAYNE *et al.* viele Synthesen für β -Thioaminosäuren vorgestellt, die die Varianz der Aminosäuren an der Ligationstelle erhöhen.^[18–20] Auch DONG *et al.* verwendete diese Strategie, um das Peptid **9** an der Ligationstelle in das nativ vorkommende Prolin-Alanin-Motiv **11** zu überführen.



Schema 5: Reaktionsmechanismus der metallfreien Desulfurierung (MFD) mit TCEP. Das thiolhaltige Peptid **9** (vgl. Schema 4) ist hier schematisch dargestellt.^[21]

Der wasserlösliche Radikalstarter Va-044 (**10**) führt unter thermischer Zersetzung bei einer Temperatur oberhalb von 40 °C zum Thiylradikal **II**. Dieses reagiert mit TCEP über das Intermediat **III** unter Abspaltung des TCEP-Sulfids weiter zum Alkylradikal **IV**. Durch die Zugabe von *tert*-Buthylmercaptan wird das Alkylradikal protoniert und somit das desulfurierte Peptid **11** gebildet.^[21]

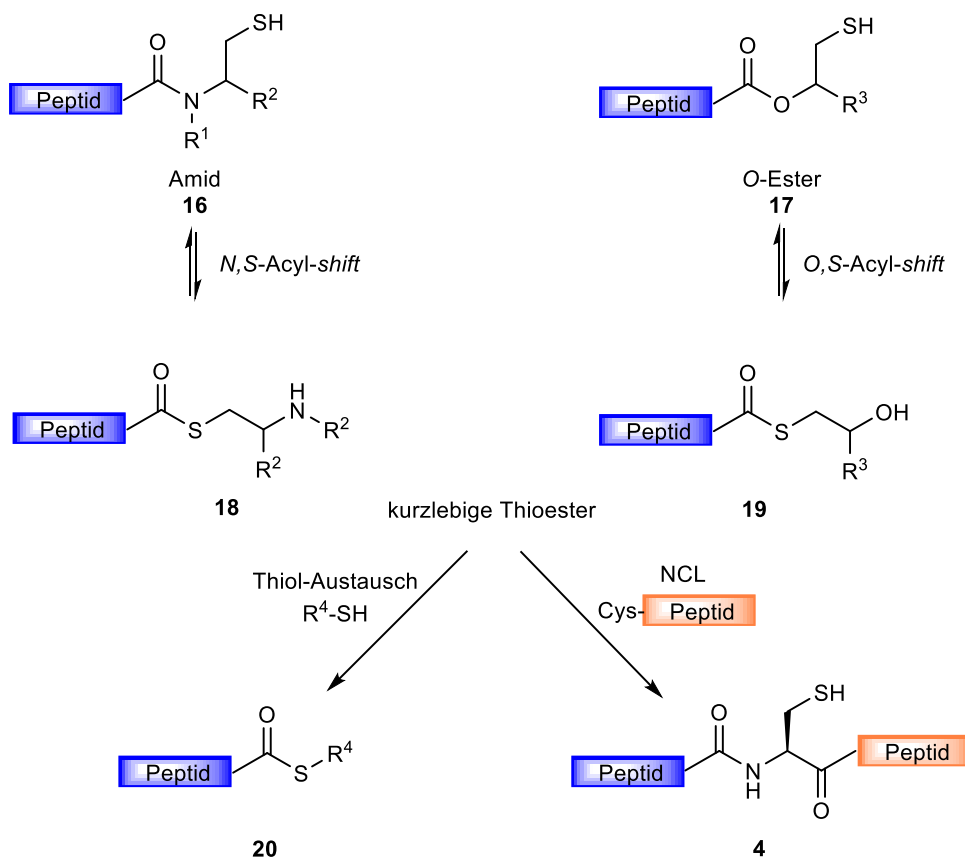
Ein weiteres Problem bei der NCL tritt bei der Ligation zwischen Asparaginsäure und Cystein auf. Analog zur Aspartimidbildung bei der Festphasen-Peptidsynthese kann es bei der NCL zwischen Cystein und Asparaginsäure durch den Angriff des Seitenkettencarboxylats zu einer intramolekularen Zyklisierung des Asparaginthioesters **12** kommen, wodurch ein Angriff des Cystein-Peptides in α - oder β -Position des zyklischen Intermediates **13** möglich wird (s. Schema 6). Der Angriff in β -Position führt zu dem unerwünschten β -Peptid **15** als Nebenprodukt.^[22] Asparagin, Glutamin und Glutaminsäure können hingegen bei einem pH-Wert von 7.2 ohne Auftreten einer Nebenreaktion in der NCL eingesetzt werden. Sinkt der pH-Wert auf 6 treten auch hier β - oder γ -Peptide als Nebenprodukt auf.^[22]



Schema 6: Nebenreaktion bei der NCL von C-terminalen Asparaginsäure-Thioestern mit Cystein-Peptiden.^[22]

Dadurch, dass die NCL ein so wertvolles Werkzeug in der Totalsynthese von Proteinen ist, wurde das Design von chemischen Systemen, die einen einfacheren Zugang zu C-terminalen Peptid-Thioestern ermöglichen, weiter vorangetrieben. Ein großes Potential hierfür haben *N,S*- oder *O,S*-Acyl-*shift*-Systeme. Diese Systeme nutzen die Fähigkeit von Amiden **16** oder

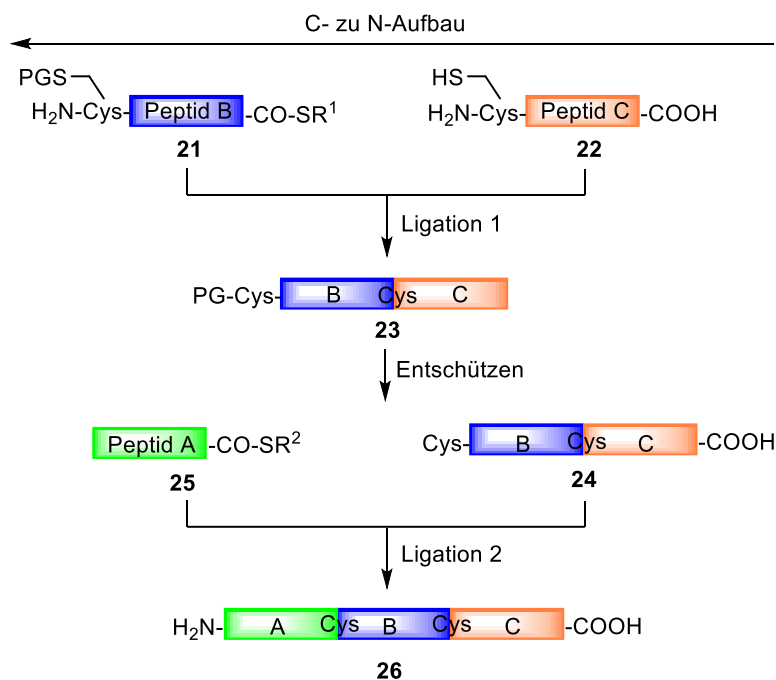
Estern **17**, die eine Thiolgruppe in 1,5-Anordnung relativ zur Carbonylgruppe tragen, sich in einem intramolekularen *N,S*- oder *O,S*-Acyl-*shift*-Mechanismus umzulagern (s. Schema 7).^[23–29]



Schema 7: Prinzip der *N,S*- und *O,S*-Acyl-*shift*-Systeme. Durch einen intramolekularen 1,5-*shift* werden die intermediären, kurzlebigen Thioester **18** und **19** ausgebildet, die dann mit einem weiteren Thiol in einen isolierbaren Thioester umgewandelt oder direkt in der Ligation mit einem Cystein-Peptid eingesetzt werden können.^[4]

Die kurzlebigen Thioester **18** und **19** die hierbei ausgebildet werden, können durch Austausch mit einem externen Thiol einen stabilen Thioester ausbilden, der durch Aufreinigung isoliert oder direkt in einer NCL eingesetzt werden kann.

Für den Aufbau großer Proteine ist es oft notwendig drei oder mehr Fragmente miteinander zu verknüpfen. Dies erfordert eine neue Schutzgruppenstrategie für die Cystein-Seitenketten und einen Aufreinigungsschritt nach jeder Ligation. Der generelle Ablauf einer sequentiellen Ligation ist in Schema 8 dargestellt. Die Aufreinigung nach jeder Ligation ist bei den meisten Methoden notwendig, da die Reaktionsbedingungen für die Abspaltung der Cystein-Schutzgruppen nicht mit den Reaktionsbedingungen der Ligation kompatibel sind. Dies würde ansonsten unweigerlich zu einem Ausbeuteverlust führen.



Schema 8: Genereller Ablauf einer sequentiellen Ligation von drei Peptidfragmenten; PG = Schutzgruppe.^[4]

KENT *et al.* konnten 2004 jedoch zeigen, dass eine Ligation von drei Fragmenten auch in einer *one-pot-Synthese* durchführbar ist.^[42] Hierzu wurde der erste Ligationsschritt zwischen den Fragmenten B und C bei pH 7 durchgeführt. Zum Entschützen des Thz-geschützten-BC-Peptides **27** (s. Abbildung 1) wurde der pH-Wert der Lösung auf pH 4 eingestellt, um den 1,3-Thiazolidin-4-(*R*)-carboxo-Rest in ein freies Cystein-BC-Peptid zu überführen.

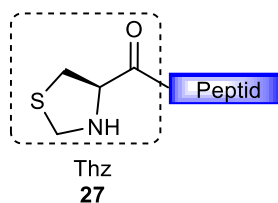
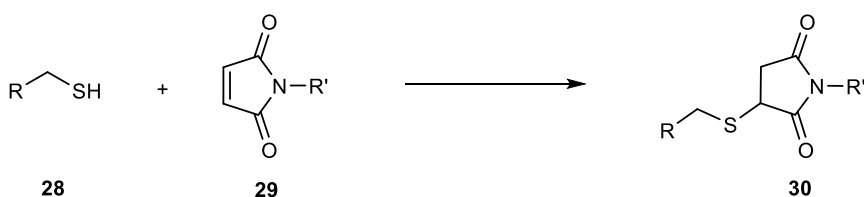


Abbildung 1: Thz-geschütztes-Cystein-Peptid.^[29]

Das dritte Thioesterfragment A wurde ohne vorherige Aufreinigung zu der Lösung gegeben und wieder pH 7 eingestellt, um mit der zweiten Ligation fortzufahren.^[29] Diese Methode wurde später auf eine Vielzahl von Protein-Totalsynthesen angewandt.^[4] Vier Jahre später konnten KENT *et al.* zeigen, dass diese Methode auch auf eine sequentielle Ligation mit vier Fragmenten ausgeweitet werden kann, und somit eine Totalsynthese von *RNase A* ermöglichte.^[30]

1.2 MICHAEL-Additionreaktion und die Anwendung von Maleimiden in der Peptidchemie

Maleimide **29** sind MICHAEL-Akzeptoren, die bei der Reaktion mit einem Thiol **28** einen Succinimid-Thioether **30** bilden (s. Schema 9). Durch die hohe Regioselektivität dieser MICHAEL-Addition der Maleimid-Doppelbindung mit Thiolen ergibt sich in der Peptidchemie ein weitreichendes Anwendungsspektrum zum schnellen und effizienten Aufbau von Biokonjugaten.



Schema 9: Allgemeines Reaktionsschema der thio-MICHAEL Addition von Maleimiden **29** mit Alky-Thiolen **28** zum Aufbau von Biokonjugaten durch Succinimid-Thioether **30**.

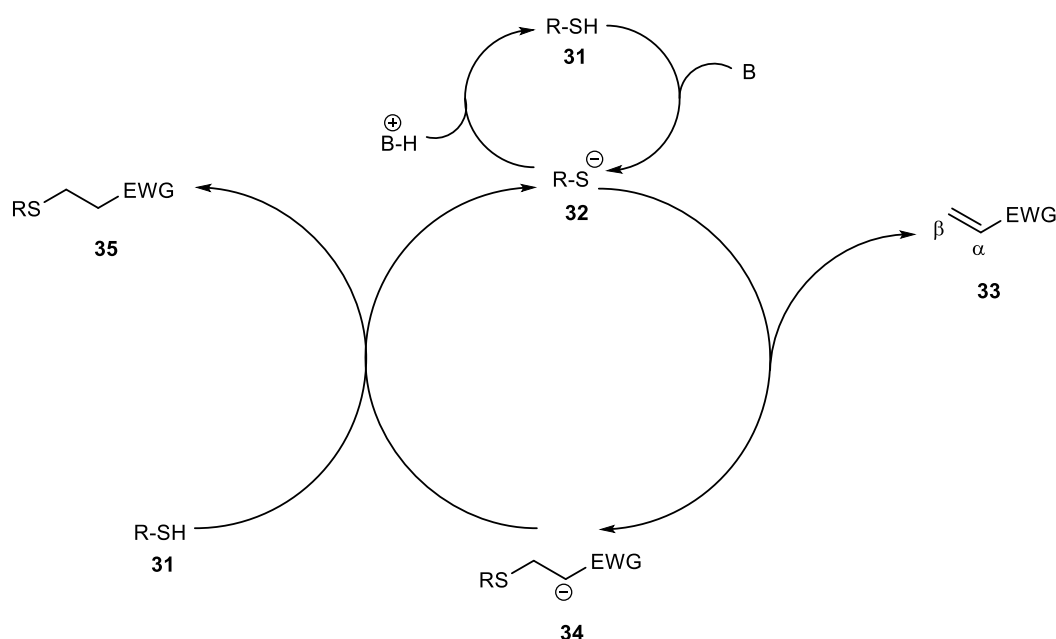
1.2.1 MICHAEL-Additionsreaktion

Die MICHAEL-Reaktion ist im Allgemeinen durch die Reaktion eines Enolats als Nukleophil in Gegenwart eines Katalysators mit einem α,β -ungesättigten Carbonyl charakterisiert. Diese Reaktion hat eine lange und erfolgreiche Geschichte in der Anwendung in der organischen Synthesechemie als hoch selektive und effiziente Methode, die unter umweltfreundlichen Reaktionsbedingungen durchgeführt werden kann.^[31] Die MICHAEL-Additionsreaktion wird als Spezialfall der konjugierten 1,4-Addition beschrieben, bei der ein nukleophiler Angriff am β -Kohlenstoffatom eines α,β -ungesättigten Carbonyls zu einer negativ geladenen Enolat-Zwischenstufe führt, welche im Anschluss durch Protonierung des Katalysators zum MICHAEL-Addukt reagiert. Diese thermodynamisch begünstigte und einfache Methode zum Aufbau von C-C- und C-X-Bindungen (X = O, N, S, Hal) innerhalb des MICHAEL-Addukts ist seit seiner Entdeckung durch ARTHUR MICHAEL im Jahre 1887^[32,33] ein wichtiges Werkzeug in der organischen Synthese kleiner Moleküle.^[34] Unter dem Namen der MICHAEL-Addition werden in der Literatur die carbo-MICHAEL-, oxa-MICHAEL-, aza-MICHAEL- und thio-MICHAEL-Addition zusammengefasst. Letztere wurde 1964 das erste Mal von ALLEN *et al.*^[35] beschrieben und ist seit dem ein unverzichtbares Werkzeug in der organischen Synthese. Insbesondere gilt der Reaktion ein wachsendes Interesse in der medizinischen, Polymer- und Materialchemie.

Die hohe Elektronendichte des Schwefelatoms macht es möglich, dass Thiole unter sehr einfachen und milden, katalysierten Reaktionsbedingungen mit einem breiten Spektrum an Substraten reagieren.

In den vergangenen Jahrzehnten wurde durch die Entwicklung von neuen Katalysatorsystemen viel zum Verständnis des Reaktionsmechanismus der thio-MICHAEL Addition beigetragen. Im Wesentlichen wird hierbei zwischen einem Basen- und einem Nukleophil-katalysierten Mechanismus unterschieden.

Der basenkatalysierte Mechanismus der thio-MICHAEL Addition wird in den meisten Fällen durch eine einfache Aminbase wie Triethylamin katalysiert. Hierbei deprotoniert die Base das Thiol **31** unter Ausbildung des Thiolats **32** und der entsprechenden konjugierten Säure. Das Thiolat ist im Normalfall ein starkes Nukleophil, welches dann die Addition an den elektronendefizienten β -Kohlenstoff des MICHAEL-Akzeptors **33** (aktivierte C=C-Doppelbindung) einleitet und zu einer Carbanion-Zwischenstufe **34** bzw. Enolat führt. Das Carbanion **34** selber ist eine starke Base und abstrahiert ein Proton der zuvor gebildeten konjugierten Säure oder eines weiteren Thiols **31** unter Bildung des Thioethers **35** als Produkt (s. Schema 10). Die Regioselektivität ist hierbei zu Gunsten des anti-MARKOVNIKOV Produktes.



Schema 10. Reaktionsmechanismus der basenkatalysierten thio-MICHAEL Additions Reaktion. Durch die Zugabe einer Base wird im ersten Katalysezyklus das Thiolat **32** gebildet. Dieses greift dann analog einer 1,4-Addition an der β -Position des MICHAEL-Akzeptors **33** unter Ausbildung des Carbanions **34** an. Dieses stellt eine starke Base dar und wird von einem weiteren Thiol **31** protoniert, wodurch der Thioether **35** als Produkt gebildet wird.^[34]

Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der thio-MICHAEL Addition ist der nukleophile Angriff des Thiolats am β -Kohlenstoff der Akzeptor-substituierten Doppelbindung. Die Reaktionsgeschwindigkeit R_{rkt} kann dadurch wie in Gleichung 1 ausgedrückt werden.

$$R_{\text{rkt}} = k[\text{R-S}^-][\text{vinyl}] \quad (1)$$

Die Konzentration des Thiolats $[\text{R-S}^-]$ kann aus dem Gleichgewicht zwischen Base und Thiol abgeleitet werden (s. Gleichung 2). Durch Zusammenfassen ergibt sich dann Gleichung 3 zur korrekten Beschreibung der Reaktionsgeschwindigkeit.^[34]

$$K_{\text{GG}} = \frac{[\text{R-S}^-][\text{B}^+-\text{H}]}{[\text{R-SH}][\text{B}]} \quad (2)$$

$$R_{\text{rkt}} = kK_{\text{GG}} \left(\frac{[\text{B}]}{[\text{B}^+-\text{H}]} \right) [\text{R-SH}][\text{vinyl}] \quad (3)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt somit im Wesentlichen von der Basizität des Katalysators sowie der Acidität des Thiols und der Elektrophilie der C=C-Doppelbindung ab. Beachtet man nun, dass die Spanne des pK_s -Wertes für Thiole zwischen 4.13 für 2,4,6-Trinitrothiophenol (36) und 11.2 für 2-Methyl-2-butanthiol (42) liegt (s. Abbildung 2), sollte der Katalysator für eine thio-MICHAEL Addition mit Bedacht gewählt werden.^[36]

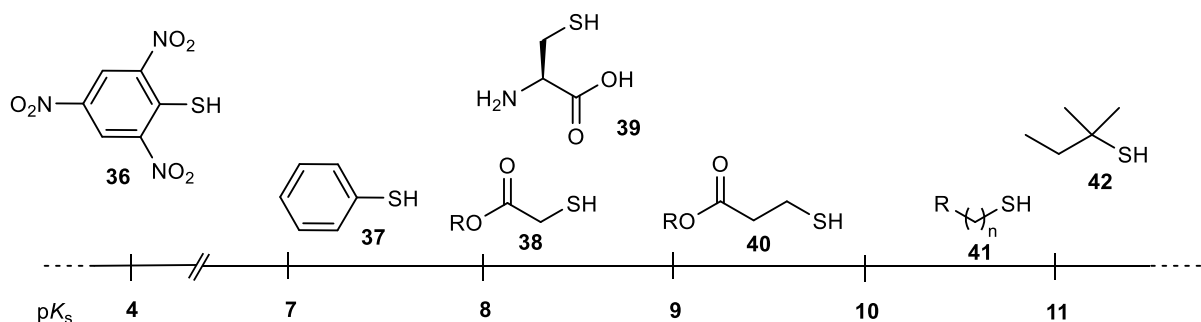
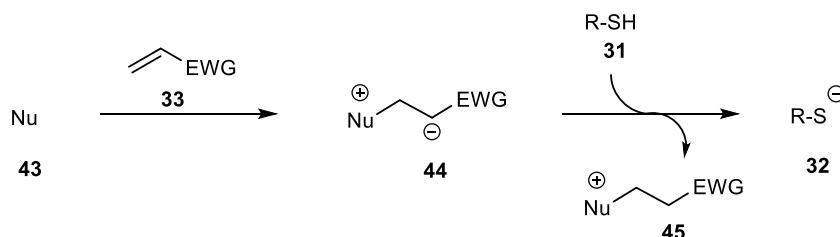


Abbildung 2: Spanne des pK_s -Wertes für Thiole.^[34]

Wird eine starke Base als Katalysator für die thio-MICHAEL Addition verwendet, d.h. wenn der pK_s -Wert der konjugierten Säure des basischen Katalysators um ein Vielfaches höher ist als der pK_s -Wert des Thiols, ist die Konzentration des Thiolates ungefähr gleich der Konzentration des basischen Katalysators. In diesem Fall ist die Reaktionsgeschwindigkeit am höchsten und kann als Reaktion pseudo-erster-Ordnung im Bezug auf die Vinyl-Konzentration aufgefasst werden. Beim Einsatz einer schwachen Base ist die Thiolatkonzentration abhängig vom Gleichgewicht zwischen Thiol und Katalysator. Arbeiten von CHAN *et al.* konnten

zeigen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Hexanthiol und Hexylacrylat stark durch den pKs-Wert des Katalysators beeinflusst werden. So ergab sich beim Einsatz von Triethylamin als Katalysator (pKs = 10.8) eine Geschwindigkeitskonstante von $2.8 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ bei einer Katalysatorkonzentration von 0.057 mol%. Beim Einsatz von 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en (DBN) als Katalysator (pKs = 13.5) und einer Katalysatorkonzentration von 0.0005 mol% wurde eine Geschwindigkeitskonstante von $5.5 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ermittelt.^[34,37] Ungeachtet der Unterschiede in der Katalysatorkonzentration, die auf Grund experimenteller Parameter angepasst werden musste, gibt CHAN an, dass der deutliche Unterschied zwischen den Geschwindigkeitskonstanten nicht nur alleine von der Basizität des DBN, sondern auch von der Fähigkeit selber als Nukleophil über einen alternativen Reaktionsmechanismus zu reagieren, herrührt. Sowohl DBN als auch DBU (1,8-Diazabicyclo[4.3.0]undec-7-en) werden in der organischen Synthese als basische Katalysatoren eingesetzt und im Wesentlichen als „nicht nukleophile starke Basen“ beschrieben.^[37–39] Es gibt jedoch auch Fälle, in denen beschrieben wird, dass DBU und DBN auch einen signifikanten nukleophilen Charakter besitzen und zum Beispiel eine aza-MICHAEL Reaktion eingehen können.^[39] Obwohl DBN einen guten Katalysator für die thio-MICHAEL Addition darstellt, bleibt zu klären ob die erhöhte Reaktivität nur von der Basizität oder auch von ihrem nukleophilen Charakter und somit von einem alternativen Reaktionsweg abhängt. Hierzu wurden Vergleichsexperimente mit *N,N,N',N'*-Tetramethylnaphthalin-1,8-diamin (DMAN) durchgeführt. DMAN ist ein Protonenschwamm und wird in der organischen Synthese als eine nicht nukleophile, organische Base eingesetzt. Der pKs-Wert von DMAN liegt bei 12.3 und ist damit deutlich basischer als vergleichsweise Triethylamin, liegt aber genau zwischen DBU (pKs = 11.6) und DBN.^[37,40] Sollte ausschließlich der pKs-Wert verantwortlich für die Steigerung der katalytischen Aktivität sein, sollte DMAN ein ähnliches Ergebnis liefern wie DBU oder DBN. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass selbst bei einer Katalysatorkonzentration von 0.057 mol% DMAN nur eine Geschwindigkeitskonstante von $0.02 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ erreicht wird. Dieses Experiment zeigt qualitativ, dass der nukleophile Charakter von DBN und DBU mit verantwortlich ist für die gesteigerte katalytische Aktivität.^[37] Auf Basis dieser Experimente kann ein weiterer, alternativer Mechanismus für die thio-MICHAEL Addition diskutiert werden.

Die nukleophil katalysierte thio-MICHAEL Addition ermöglicht es die starke Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstante vom pKs-Werts des Thiols zu reduzieren.^[34] Studien von CHAN *et al.*^[41,42] und LIU *et al.*^[43] konnten zeigen, dass die Verwendung eines starken Nukleophils (**43**) in der thio-MICHAEL Addition, dieses nicht selbst die Reaktion katalysiert, sondern mit einer elektronendefizienten Doppelbindung (MICHAEL-Akzeptor, **33**) unter Ausbildung eines intermediären, zwitterionischen Enolats **44** reagiert. Diese starke Base



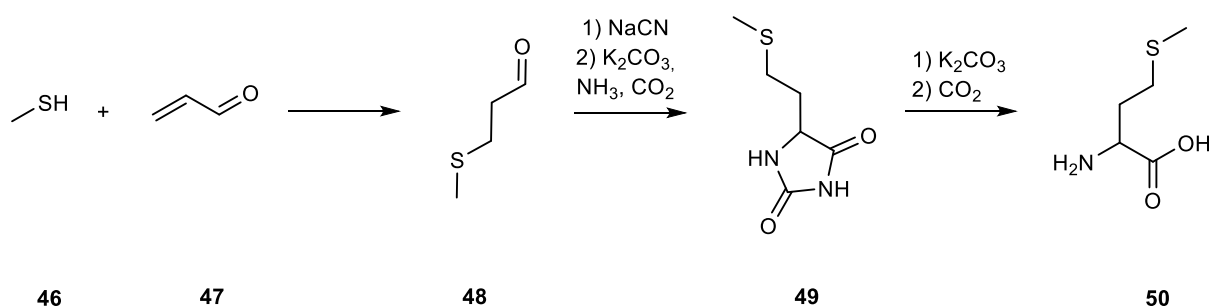
Schema 11: Nukleophil-katalysierte Thiolatbildung der thio-MICHAEL Addition. Das Nukleophil **43** reagiert mit dem MICHAEL-Akzeptor **33** unter Ausbildung des intermediären Zwitterions **44**, welches eine starke Base darstellt und ein Thiol **31** zum Thiolat **32** deprotoniert. Das so generierte Thiolat **32** reagiert analog zu dem Mechanismus in Schema **10**.^[34,41]

wiederum kann das Thiol **31** zum Thiolat **32** deprotonieren (s. Schema 11). Durch diesen Reaktionsweg hängt die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr vom pK_s-Wert, sondern von der Nukleophilie des Katalysators und dadurch von der Konzentration des gebildeten Thiolates **32** ab. Je höher die Nukleophile, desto höher die Konzentration des Thiolats. Nach der Bildung des Thiolats verläuft die Reaktion analog zu dem basenkatalysierten Mechanismus (s. Schema 10).

Im Vergleich zum basenkatalysierten Mechanismus verläuft die nukleophil-katalysierte thio-MICHAEL Addition mit einer höheren Umsatzrate und bei geringerer Katalysatorkonzentration ab.^[34] Li *et al.* konnte bei NMR-Experimenten an Metacrylaten, die unter thio-MICHAEL Additionsreaktionsbedingungen eine sehr geringe Aktivität der C=C-Doppelbindung aufweisen, zeigen, dass Trialkylphosphine als Katalysator selbst bei sehr geringer Katalysatorkonzentration eine extrem hohe Reaktivität aufweisen und zu einem quantitativen Umsatz führen. So wurde beim Einsatz von Dimethylphenylphosphin (DMPP) als nukleophiler Katalysator ein quantitativer Umsatz der Reaktanden in wenigen Minuten erreicht, wohingegen beim Einsatz von Triethylamin oder *n*-Pentylamin mehrere Stunden benötigt wurden, um einen hohen Umsatz zu erzielen.^[44] Trotz der signifikanten Unterschiede der Mechanismen, erfüllen beide das Kriterium einer hocheffizienten „Klickreaktion“, die es ermöglicht unter einfachen Reaktionsbedingungen mit einer hohen Regioselektivität Biokonjugate aufzubauen.^[34]

Das bedeutenste Beispiel für eine, im industriellen Maßstab angewandte thio-MICHAEL Addition ist die chemische Synthese von DL-Methionin (**50**). Ausgehend von Methylmercaptan (**46**) findet im ersten Schritt eine thio-MICHAEL Addition des Thiols an Acrolein (**47**) statt. Der entstandene 3-Mercaptopropionaldehyd (**48**) wird dann mit Natriumcyanid zum intermediären Cyanhydrin umgesetzt und in einem Kreislaufprozess mit Ammoniak und Kohlenstoffdioxid in das Hydantoin **49** umgewandelt. Durch Verseifen mit Kaliumcarbonat und anschließendem

Umsetzten mit Kohlenstoffdioxid wird das racemische DL-Methionin (**50**) erhalten (s. Schema 12).^[45]



Schema 12: Die im industriellen Maßstab angewandte, chemische Synthese des racemischen DL-Methionin (**50**). Ausgehend von Methylmercaptan (**46**) findet im ersten Schritt eine thio-MICHAEL Addition des Thiols an Acrolein (**47**) statt.^[45]

1.2.2 Maleimide

Unabhängig von den zuvor diskutierten Reaktionsmechanismen zum Aktivieren der thio-MICHAEL Addition über einen basischen oder nukleophilen Katalysator, spielt ebenso die Struktur der aktivierten C=C-Doppelbindungen, dem sogenannten MICHAEL-Akzeptor, eine wichtige Rolle. In der Regel gilt, je elektronenärmer die C=C-Doppelbindung, desto reaktiver ist diese in einer MICHAEL-Additionsreaktion.^[36,41] Typische MICHAEL-Akzeptoren, die in der Literatur häufig zu finden sind, sind Acrylate, Methacrylate, Vinyl-Sulfone und Maleimide. Diese unterscheiden sich deutlich in ihrer Elektrophilie und dementsprechend in ihrer Reaktivität (s. Abbildung 3).^[34,46]

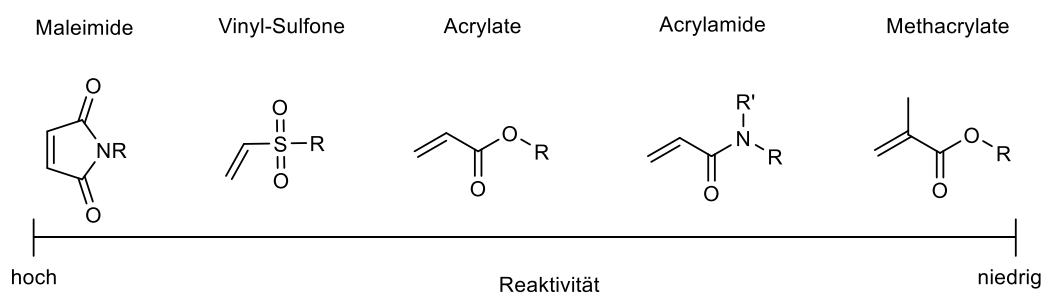


Abbildung 3: Reaktivität der häufig in der Litaratur verwendeten MICHAEL-Akzeptoren. Maleimide besitzen die höchste Reaktivität und finden dadurch die häufigste Anwendung.^[34]

Maleimide haben von allen MICHAEL-Akzeptoren die höchste Reaktivität und zeichnen sich in der thio-MICHAEL Addition durch ihre hohe Regioselektivität gegenüber dem Thiol aus. Die hohe Reaktivität der C=C-Doppelbindung lässt sich im Wesentlichen auf die in *cis*-Konfiguration stehenden Carbonylgruppen in Verbindung mit einer Bindungswinkeldistorsion und der damit einhergehenden Ringspannung zurückführen.^[36] Maleimide sind die Imide der Maleinsäure, deren Synthese über einen ringöffnenden nukleophilen Angriff der entsprechend substituierten Amine an Maleinsäureanhydrid und einer anschließenden Dehydratisierung verläuft.^[47,48] Die Biokonjugationsreaktion zwischen einem Maleimid und einem Cystein-Thiol innerhalb eines Proteins wurde das erste Mal 1953 von BAILEY *et al.* im Rahmen einer Methodenentwicklung zur Extraktion, Aufreinigung und anschließender Strukturaufklärung von Aktin, beschrieben. Durch eine Titration mit *N*-Methylmaleimid (NEM) in Gegenwart von Natriumnitroprussid konnten die Cystein-Thiole identifiziert und quantifiziert werden.^[49] Kurz danach (1956) beschrieben WARD *et al.* die erste Konjugation zweier Proteine durch die Verwendung von *N,N'*-(*o*-Phenylen)dimalimid.^[50] In den darauf folgenden 1960er und 1970er Jahren wurden viele Maleimid-Derivate entwickelt, um die Cystein-Thioleinheiten innerhalb von Proteinen zu identifizieren. Hierzu wurde 1960 von TUPPY *et al.* erstmals *N*-(4-Dimethylamino-3,5-dinitrophenyl)maleimid (DDPM) als Farbreagenz eingesetzt.^[51] Die gelbe Färbung ermöglicht es schon rein optisch cysteinhaltige Peptide zu identifizieren und zu isolieren. Durch die Markierung mit DDPM und anschließendem enzymatischen Verdau durch Pepsin, gelang es TUPPY das tierische, globuläre Albumin Protein (BSA) zu sequenzieren.^[51] Ein weiterer Fortschritt war die Entwicklung von fluoreszenzmarkierten Maleimiden, die es ermöglichten Proteine mit einfachen Methoden unter dem Mikroskop sichtbar zu machen und somit biologische Prozesse verfolgen zu können. 1976 wurde von WU *et al.* erstmalig

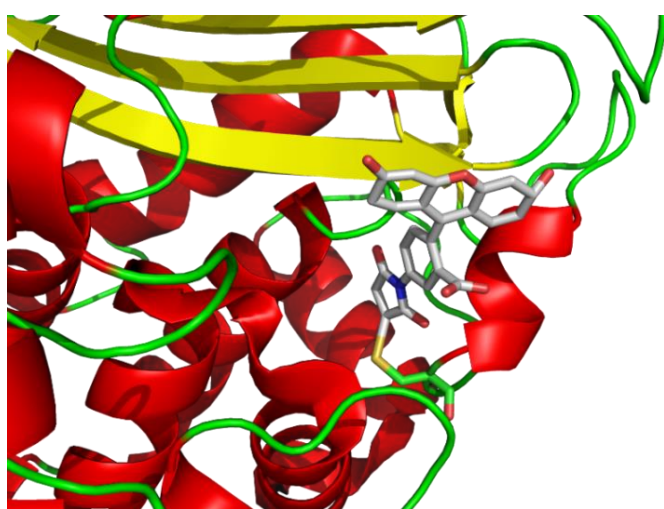
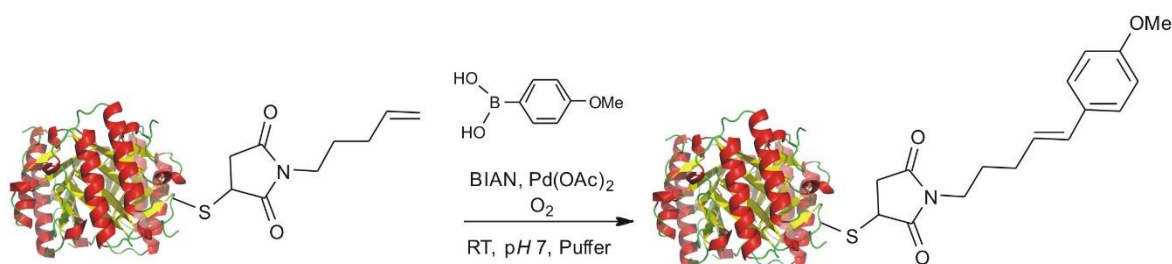


Abbildung 4: Ausschnitt aus der Kristallstruktur der Klasse A Lactamase PenP (gelb = β -sheet, rot = α -Helix, grün = loop) mit einem Fluorescein-Succinimid-Fluoreszenzmarker (grau). PDB-Code: 3M2J.

N-(1-Pyren)maleimid als Fluoreszenzmarker für Proteine beschrieben.^[52] *N*-(1-Pyren)maleimid selbst ist im wässrigen Medium nicht fluoreszent. Erst durch die Reaktion mit einem Thiol unter Ausbildung des Succinimid-Thioethers setzt die Fluoreszenz ein. Die Konjugationsreaktion verläuft relativ schnell und kann durch

den Anstieg der Intensität der Fluoreszenz verfolgt werden.^[52] Fluoreszenzmarkierungen sind in der makromolekularen Chemie ein nützliches Werkzeug zur Strukturaufklärung und tragen im Wesentlichen zum Verständnis der Dynamik von Makromolekülen bei. Fluoreszenzmarker (s. Abbildung 4) ermöglichen es außerdem durch eine Fluoreszenzpolarisationsmessung Rückschlüsse auf die Größe, Form und Flexibilität eines Proteins zu ziehen.^[52,53] Durch ein seitenspezifisches *labeling* mit polaritätssensitiven Fluoreszenzmarkern lassen sich somit Aussagen über die Umgebung des aktiven Zentrums von Proteinen treffen.^[52,54,55] Nach dem heutigen Stand der Technik, bietet jedoch die NMR-Spektroskopie eine genauere, atom aufgelöste Alternative, gerade im Bezug auf die Strukturaufklärung und Dynamik von Proteinen.^[56–58] Dennoch bleibt die Konjugationsreaktion von Maleimiden mit einem Cystein-Thiol eines der wichtigsten Werkzeuge der Biochemie zur Modifikation von Proteinen. Durch die Konjugation können weiter funktionelle Gruppen eingeführt werden, die eine mehrstufige Funktionalisierung von Peptiden oder auch Proteinen ermöglicht. So konnten 2014 DEKKER *et al.* durch Konjugation des Enzyms 4-Oxalocrotonat-Tautomerase (4-OT R⁶¹→C) mit einem Alken-Maleimide eine anschließende HECK-Reaktion an dem funktionalisierten Enzym unter physiologischen Bedingungen ohne Verlust der Tertiärstruktur, durchführen (s. Schema 13).^[59]



Schema 13: HECK-Reaktion unter physiologischen Bedingungen an einem Succinimid-Alken-modifizierten Enzym (4-OT, gelb = β -sheet, rot = α -Helix, grün = loop, PDB-Code: 1OTF).^[59]

Auch in der medizinischen Chemie werden immer mehr Antikörperkonjugate (*engl.*: Antibody-drug-conjugate; ADC) eingesetzt. Dabei handelt es sich um rekombinante monoklonale Antikörper (*engl.*: monoclonal antibodies; mAb), die kovalent über einen synthetischen Linker an einen zytotoxischen Wirkstoff gebunden sind.^[60] Das erste Antikörperkonjugat das als Arzneimittel mit einem Succinimid-Thioether als Linker zugelassen wurde, war das 2013 unter dem Handelsnamen *Adcetris*® in Europa erschienen Monomethyl-Auristatin E (MMAE) anti-CD30-Antikörperkonjugat, das zur Behandlung des HODGKIN-Lymphoms und dem systemischen anaplastischen großzelligen Lymphom eingesetzt wird (s. Abbildung 5).^[61] Solche Antikörperkonjugate besitzen den großen Vorteil, dass sie die hohe Antitumorstärke von stark zytotoxisch wirkenden kleinen Moleküle wie Auristatin oder Maytansinoid, mit einem

Molekulargewicht von 300-1000 Da und einem subnanomolaren IC_{50} -Wert, mit der hohen Selektivität, Stabilität sowie dem vorteilhaften pharmakokinetischen Profil der monoklonalen Antikörper kombiniert.^[60] Seit der Zulassung von *Adcetris*® 2013 sind bis heute noch ca. 30 weitere Antikörperkonjugate entwickelt worden und insgesamt 60 ADC's (alle für onkologische Anwendungen) befinden sich zurzeit in klinischen Testphasen.^[62]

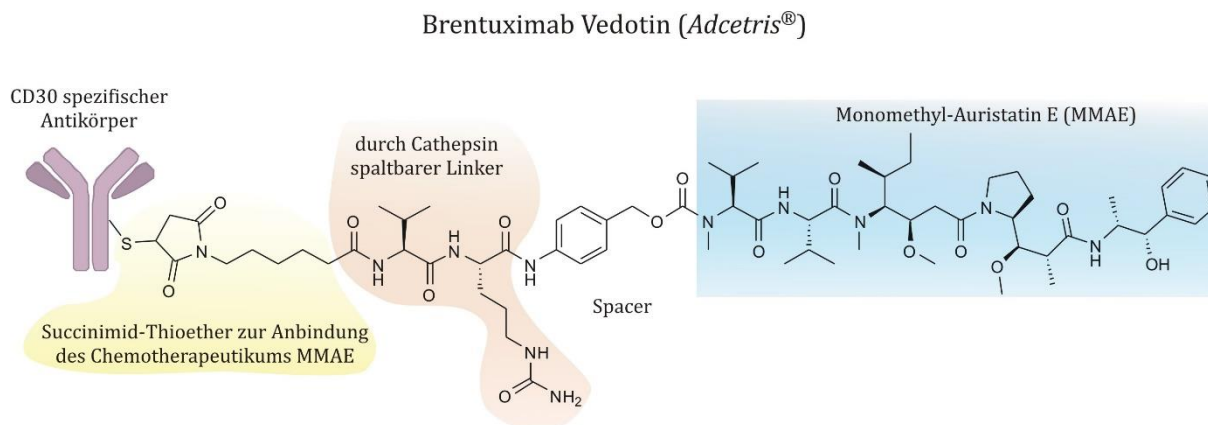


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Antikörperkonjugates Brentuximab-Vedotin (*Adcetris*®) zur Behandlung des HODGKIN-Lymphoms. Der Wirkstoff MMAE wird über einen Succinimid-Thioether kovalent an ein Cystein in der sogenannten „hinge“-Region des CD30-spezifischen Antikörpers gebunden. Zwischen Succinimid und Wirkstoff befindet sich ein durch die Protease Cathepsin spaltbarer Linker, der die Freisetzung des Wirkstoffs erst innerhalb der Tumorzelle garantiert. Cathepsin spaltet Amidbindungen selektiv zwischen Valin und Citrullin.^[60,61]

Neben *Adcetris*® gibt es nur noch zwei weitere, in Europa zugelassene Antikörperkonjugate, die einen Succinimid-Thioether beinhalten. Trastuzumab emtansine (T-DM1) und ado-Trastuzumab emtansine. Beide haben den Tumornekrosefaktor TNF-RSF8 und den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor HER2 als *target*.^[60] Ein generelles Problem beim Aufbau von ADC's ist, dass normalerweise mehr als nur ein Wirkstoffmolekül pro Antikörper gebunden sein muss, damit die zytotoxische Wirkung erhalten bleibt (effektives Wirkstoff zu Antikörper Verhältnis; *eng.l.*: efficient drug/antibody ratio; DAR).^[61] Aus diesem Grund wurde von GENENTECH das THIOMAB™-Verfahren entwickelt, welches es ermöglicht durch Punktmutation zielgerichtet Cysteine in die Antikörper einzuführen, ohne dass die Erkennung für das Antigen eingeschränkt oder die Faltung des Antikörpers beeinträchtigt wird.^[63,64] Dadurch kann der DAR-Wert gesteigert werden und eine effektiveres Medikament erhalten werden. Dennoch bleiben die Antikörper mit ihren cysteinreichen und äußerst komplexen „hinge“-Regionen sowie ihrer multidomänen Struktur und molekularen Größe ein schwer zu handhabendes System, welches durch seine divalente Natur ungewollte Rezeptorwechselwirkungen eingehen kann. Diese Nachteile der ADC's haben in den letzten Jahren das Forschungsfeld der nicht-IgG-bindenden Proteine entstehen lassen. Diese Proteine besitzen nur die Erkennungssequenz der Antikörper,

die zur spezifischen Anbindung an ein Antigen notwendig ist. Aufgrund ihrer geringeren Komplexität und reduzierten Größe können diese dann leichter in das Tumorgewebe eindringen und somit für eine homogenere Verteilung des Wirkstoffes sorgen.^[65] Besonders synthetische Fragmente des Ankyrin-Proteins, sogenannte DARPins (engl.: *Designed Ankyrin Repeat Proteins*), zeichnen sich durch ihre nahezu identische Affinität eines Antikörpers zu einem Antigenen aus und sind mit einer Molekülmasse von ca. 14 kDa um das Zehnfache leichter als ein IgG-Antikörper. Das natürlich vorkommende Ankyrin-Repeat-Motiv, aus dem sich die DARPins ableiten, besteht aus 33 Aminosäuren, die zwei α -Helices bilden, welche über einen β -turn verbunden sind. DARPins besitzen mindestens drei dieser Repeat-Einheiten, um die Ausbildung einer Tertiärstruktur zu gewährleisten. Sie können dann das Verhalten eines Agonisten, Antagonisten, inversen Agonisten oder eines Enzyminhibitors annehmen.^[66,67] Des Weiteren zeichnen sich diese Proteinfragmente durch ihre thermische und biosphysikalische Stabilität sowie durch ihre Proteaseresistenz aus.^[68,69] PLÜCKTHUN *et al.* konnten 2013 zeigen, dass synthetische DARPins, die ein nicht natürlich vorkommendes Cystein enthalten über ein Maleimide-Auristatin-Derivat zu einem zytotoxischen Biokonjugat aufgebaut werden können. Durch eine weitere Modifikation des DARPins, dem Einbau von Azidohomoalanin, konnte zusätzlich noch das globuläre Albumin über eine 1,3-Dipolare Cycloaddition gebunden werden, wodurch die Halbwertszeit des Biokonjugates innerhalb des Blutserums deutlich erhöht wurde. Diese Biokonjugate (s. Abbildung 6), die durch die einfache Handhabung der thio-MICHAEL-Addition zwischen einem Maleimid und einem Cystein ermöglicht werden, besitzen eine hohe Wirksamkeit und eine verbesserte pharmakokinetische Leistung im Vergleich zu anderen Antikörper-Konjugaten.^[65]

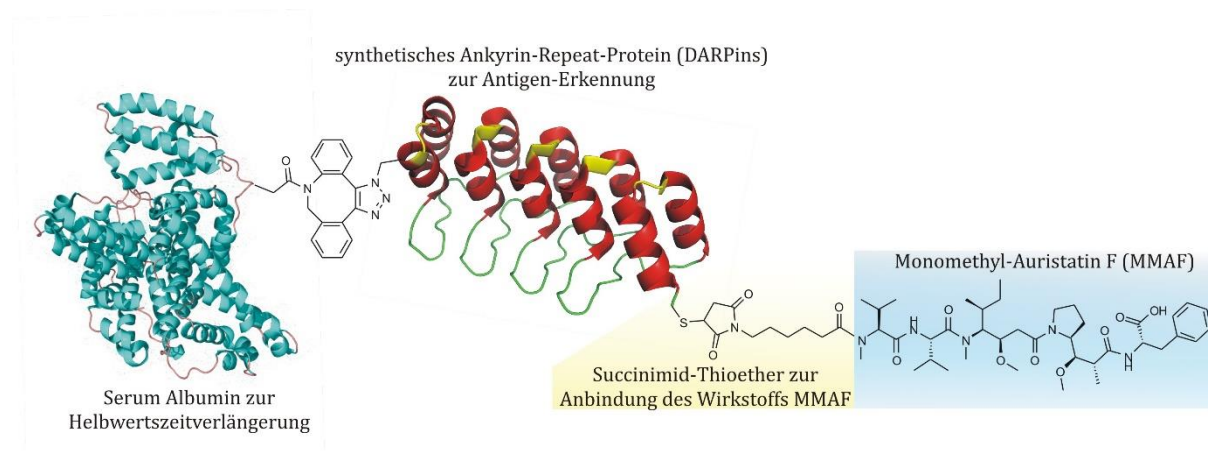


Abbildung 6: DARPIn mit fünf Wiederholungseinheiten (mittig: gelb = β -turn, rot = α -Helix, grün = loop, PDB-Code: 4JB8) mit Succinimid-Thioether verbundenem Monomethyl-Auristatin F. Zur Erhöhung der Halbwertszeit des Wirkstoff-Konjugates innerhalb des Blutserums wurde über eine 1,3-Dipolare Cycloaddition das globuläre Albumin der Maus (MSA) (links: türkis = α -Helix, hellrot = loop; PDB-Code: 3V09) an das DARPIn-Protein gebunden.^[65]

Ein weiteres Anwendungsfeld für Maleimide in der medizinischen Chemie ist die Konjugation von sogenannten „Affibodies“ mit einem Radiolabel zur Krebsdiagnostik. *Affibodies* sind kleine, aus dem Protein A abgeleitete, nicht immunglobuläre Proteine mit 58 Aminosäuren, die sich zu drei α -Helices zusammenlagern. Sie sind synthetisch einfach herzustellen und gehören zu der kleinsten Klasse von antigenbindenden Proteinen.^[70,71] Durch die Anbindung eines Maleimid funktionalisierten chelatisierenden Komplexbildners wie DOTA finden sie eine häufige Anwendung bei der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) mit Cu^{64} oder In^{111} als Radionuklid (s. Abbildung 7).^[72–74]

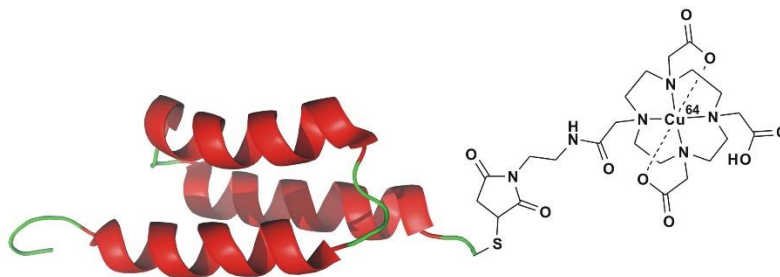


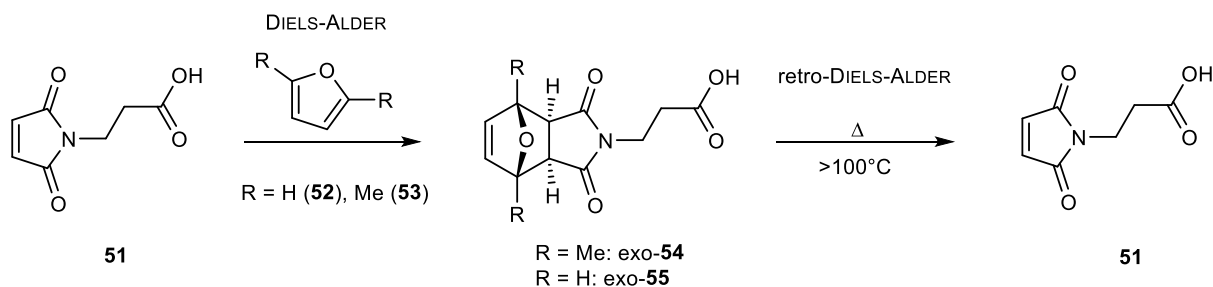
Abbildung 7: *Affibody*-Protein (rot = α -Helix, grün = *loop*, PDB-Code: 2KZJ) das über einen Succinimid-Thioether mit dem chelatisierenden Komplexbildner DOTA verbunden ist und für den Einsatz in der Positronen-Emissions-Tomographie das Radionuklid Cu^{64} trägt.^[72,74]

Die Konjugation von Biomolekülen durch die thio-MICHAEL-Reaktion mit einem Maleimid umfasst mittlerweile ein weites Feld von Anwendungen. So konnten neben den zuvor genannten medizinischen und analytischen Anwendungen Maleimide auch zum Aufbau von selbstassemblierenden Fibrillen-Systemen^[75], Antikörper-Polymer-Konjugaten^[76] und zur Proteinimmobilisierung^[77–79] genutzt werden. Weiterin sind Maleimide in den Materialwissenschaften zur Funktionalisierung von Oberflächen wie Nanopartikeln ein unverzichtbares Werkzeug geworden.^[34,80–83]

Jenseits der großen Biokonjugate mit Proteinen findet die thio-MICHAEL-Addition mit Maleimiden jedoch kaum Beachtung. Zur Anwendung von Maleimiden in der Synthese von Peptiden existieren bis dato nur eine Handvoll Publikationen. Hervorzuheben sind dabei die Arbeiten von GRANDAS *et al.* zur selektiven Adressierung von Maleimiden durch eine geeignete Schutzgruppenstrategie, sowie den Aufbau von zyklischen Peptiden durch eine intramolekulare thio-MICHAEL-Addition.

Aufgrund der hohen Reaktivität der Maleimid-Doppelbindung müssen diese bei der Verwendung in der Synthese von maleimidhaltigen Peptiden bzw. Maleimid-Peptidbausteinen vor etwaigen Nukleophilen wie Aminen oder Thiolen geschützt werden. GRANDAS *et al.* verwenden hierfür Furan (52) oder Dimethylfuran (53), das in einer DIELS-ALDER-Reaktion (DA)

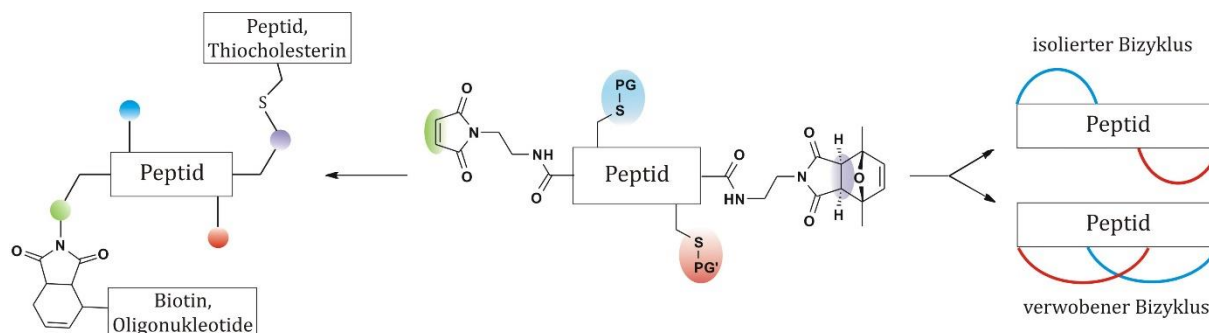
mit der Doppelbindung reagiert und als temporäre Schutzgruppe fungiert. Diese kann anschließend in einer thermisch aktivierten retro-DIELS-ALDER-Reaktion wieder entfernt werden (s. Schema 14).^[84] Im Falle der Dimethylfuran DIELS-ALDER-Addukte konnte das *exo*-Produkt **54** selektiv auf Grund seiner Stabilität, bzw. der Instabilität des *endo*-Adduktes, gegenüber der Behandlung mit konzentriertem Ammoniak erhalten werden. Das *exo*-Produkt **55** aus der Umsetzung mit Furan (**52**) kann durch kinetische Kontrolle und anschließender diastereoselektiver Auskristallisation dargestellt werden.^[84]



Schema 14: Temporäre Schützung der Doppelbindung des von GRANDAS *et al.* in der Peptidsynthese verwendeten 3-Propionsäuremaleimids (**51**) mit einem Furan-Derivat. Die Doppelbindung reagiert in einer DIELS-ALDER-Reaktion unter thermodynamischer Kontrolle zum *exo*-Addukt (**54**, **55**). Wird das DIELS-ALDER-Addukt Temperaturen oberhalb von 100 °C ausgesetzt, findet die thermisch aktivierte Cycloreversion (retro-DIELS-ALDER-Reaktion) unter Rückbildung der Maleimid-Doppelbindung statt.^[84]

Durch die Schutzgruppenstrategie der *exo*-DIELS-ALDER-Addukte für 3-Propionsäuremaleimid (**51**) war es GRANDAS *et al.* möglich Oligonukleotide an der Festphase aufzubauen, die nach abschließender retro-DIELS-ALDER-Reaktion ein terminales Maleimid tragen, das anschließend in einer weiteren Konjugationsreaktion mit Thiolen umgesetzt werden konnte. Weiterhin konnten durch den Einbau eines geschützten und eines ungeschützten Maleimides in ein Peptid, diese selektiv adressiert und somit zwei nacheinander ablaufende Konjugationen durchgeführt werden (s. Schema 15, links). Die Methodik der duale Konjugation wurde durch einen dreistufigen Konjugations- Entschütungs- Konjugations-Prozess verwirklicht und erweitert die Möglichkeiten der Biokonjugation zur Synthese komplexer Moleküldatenbanken und unterschiedlich funktionalisierten Leitstrukturen.^[85] Neben der Konjugation mit Thiolen konnten auch Dien-modifizierte Biotin und Dien-Oligonukleotide zur Konjugation der Maleimid-Doppelbindung in einer DIELS-ALDER-Reaktion erfolgreich eingesetzt werden (s. Schema 15, links).^[85] Eine weitere Anwendung der unterschiedlich geschützten Maleimide in Kombination orthogonal geschützter Cysteine innerhalb eines Peptides, ist die intramolekulare thio-MICHAEL-Reaktion zum Aufbau bizyklischer Peptide (s. Schema 15, rechts).

Diese Schutzgruppenstrategie ermöglichte 2013 GRANDAS *et al.* die Synthese von isoliert- und verwoben-bizyklischen Peptiden die bis zu dreiundvierzig-gliedrige Ringe beinhalteten.^[86]



Schema 15: links: Durch die Kombination von geschützten und ungeschützten Maleimiden innerhalb eines Peptides können diese nacheinander in Konjugationsreaktionen adressiert werden. Dies ermöglicht den Aufbau komplexer Moleküldatenbanken und unterschiedlich funktionalisierten Leitstrukturen. Neben der Konjugation mit Thiolen konnte von GRANDAS *et al.* auch der Einsatz von Dienen zur Konjugation in einer DIELS-ALDER-Reaktion erfolgreich durchgeführt werden.^[85] **rechts:** Unterschiedlich geschützte Maleimide in Kombination orthogonal geschützter Cysteine innerhalb eines Peptides, ermöglichen den Aufbau bizyklischer Peptide durch eine intramolekulare thio-MICHAEL-Reaktion. Durch selektive Entschützung der einzelnen Schutzgruppen lassen sich verschiedene Architekturen der bizyklischen Peptide darstellen. GRANDAS *et al.* konnten mit dieser Strategie isoliert- und verwoben-bizyklische Peptide mit bis zu dreiundvierzig-gliedrigen Ringen aufbauen.^[86]

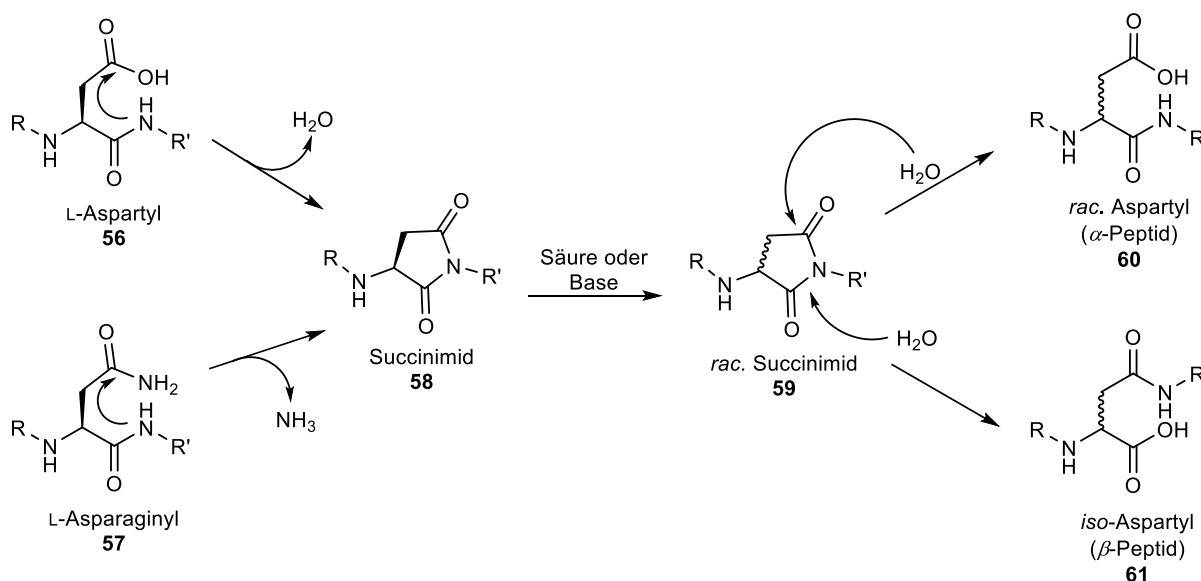
Um ein Maleimid an jeder beliebigen Position entlang des Peptidrückgrates einfügen zu können, wurde von GRANDAS *et al.* das Dimethylfuran-geschützte Propionsäuremaleimid *exo*-54 durch eine Kupplungsreaktion an das ε -NH einer Lysin-Seitenkette eingeführt. Dieses Lysin-Derivat konnte ohne Einschränkungen in der Peptidfestphasensynthese (SPPS) eingesetzt werden. Der Aufbau des ersten Ringes der bizyklischen Peptide erfolgt bereits beim Abspalten des Peptides vom polymeren Trägerharz unter sauren Bedingungen, bei einer nanomolaren Konzentration durch die zeitgleiche Abspaltung der säurelabilen Schutzgruppe eines der Cystein-Thiole. Dieses reagiert dann mit dem *N*-terminalen ungeschützten Maleimid. Danach kann das, orthogonal mit *tert*-Butylmercaptan, geschützte Cystein selektiv mit TCEP entschützt werden und durch Erhitzen des Peptides unter Mikrowelleneinstrahlung bei 90 °C der zweite Zyklus ausgebildet werden. Die Zyklisierung von Peptiden über eine intramolekulare thio-MICHAEL-Addition wird durch keine Seitenkettenfunktionalität der natürlich vorkommenden Aminosäuren beeinträchtigt und verläuft bis zu einer Ringgröße von 12 Aminosäuren unter sehr guten Ausbeuten.^[86] Die hier aufgeführten Beispiele von Anwendungsbereichen für Maleimide in der Biokonjugation zeigen, dass sie in diesem Gebiet eine große Aufmerksamkeit genießen. Dennoch gibt es kein Interesse an der Stereochemie, die zwangsläufig bei der thio-MICHAEL-Addition auftritt. So gibt es bis heute keine Veröffentlichung über den Einfluss des Stereozentrums an dem Succinimid-Ring auf die Konformation von Peptiden oder Konjugaten sowie Studien zur Strukturaufklärung solcher Verbindungen mittels NMR-Spektroskopie.

1.3 Succinimide innerhalb von Peptiden und Proteinen

Ein zentraler Prozess der Genexpression, der in den Zellen aller Lebewesen stattfindet, ist die Proteinbiosynthese. Durch Transkription der in den Genen der DNA enthaltenen Grundinformation wird mit Hilfe des Enzyms RNA-Polymerase die mRNA aufgebaut. Der nächste Schritt, die sogenannte Translation, findet an den Ribosomen statt, die sich frei im Cytoplasma oder gebunden am endoplasmatischen Retikulum befinden. Jedes Ribosom, das an die mRNA bindet, synthetisiert entsprechend der Sequenz ein Protein aus den in der Zelle verfügbaren 21 proteinogenen Aminosäuren. Größe und Form der Proteine richtet sich dabei nach der zuvor in den Genen der DNA kodierten Information. Nach erfolgter Biosynthese können Proteine einige posttranslationale Modifikationen (PTM) durchlaufen, die ausschlaggebend für ihre räumliche Struktur und Funktionalität sind.^[87] Dabei wird zwischen enzymatischen und nichtenzymatischen kovalenten Modifikationen der Aminosäuren unterschieden. Insgesamt wurden bereits über 140 verschiedene solcher modifizierten Aminosäuren in Proteinen beschrieben und charakterisiert.^[88]

Neben der homöostatischen Funktion von Proteasen, die den Lebenszyklus und auch die Funktion von Proteinen im Intra- oder Extra-Zellularraum eines Organismus steuern, indem sie das kovalente Peptidrückgrat spalten und die so erhaltenen neuen Proteinfragmente, die meist eine anderen Funktion besitzen, oder Aminosäurebausteine dem Zellreservoir hinzufügen^[89], dienen auch die posttranslationalen Modifikationen von Proteinen der Regulation von verschiedenen zellulären Abläufen, durch Veränderung der Proteinaktivität oder deren dynamische Interaktion mit anderen Proteinen.^[89-91] Die häufigsten posttranslationalen Modifikationen sind Acetylierung, Phosphorylierung, Oxidation, Acylierung, Glykosylierung, Methylierung, Nitrierung, Ubiquitinierung und Desamidierung.^[92]

Eine typische posttranslationale Modifikation von Proteinen, die spontan auftritt und sowohl der Regulierung von biochemischen Prozessen dient, als auch für zelluläre und physiologische Defekte^[93] verantwortlich ist, ist die Bildung von Amino-Succinimiden (Asu). Die Ausbildung dieser Amino-Succinimide kann dabei über zwei verschiedene Wege ablaufen: Durch Desamidierung einer Asparaginy-Seitenkette **57** oder durch Kondensation einer Aspartyl-Seitenkette **56**. In beiden Fällen greift das Amid-NH der in C-terminalen Richtung benachbarten Aminosäure nukleophil an dem Carbonyl-Kohlenstoffatom der Seitenkette an. Unter Abspaltung von Ammoniak respektive Wasser wird das Succinimid **58** ausgebildet (s. Schema 16).^[94] Findet die Reaktion an einem Aspartyl-Rest statt, wird das Succinimid-Intermediat auch als Aspartimid bezeichnet. Die Aspartimidbildung spielt auch bei der organischen Festphasensynthese von Peptiden (SPPS) eine große Rolle, da sie zu den am häufigsten dokumentierten Nebenreaktionen in der SPPS gehört.^[95]



Schema 16: Succinimid-Bildung (58) innerhalb von Peptiden oder Proteinen, ausgehend von Asparagin 57 unter Desamidierung oder Asparaginsäure 56. Unter sauren oder auch basischen Bedingungen kann es zu einer Racemisierung durch Enolisierung des Succinimides (59) kommen. Durch anschließende Hydrolyse des racemischen Succinimides 59 wird sowohl das racemische α -Peptid 60 als auch das β -Peptid 61 mit einem *iso*-Aspartyl innerhalb des Peptiderückgrates erhalten.^[94,95]

Die Bildungsrate des Succinimides hängt von mehreren Faktoren ab, wie zum Beispiel der Primär- und Tertiärstruktur des Proteins, sowie des pH-Wertes.^[94,96,97] Um den Zusammenhang zwischen Primärstruktur, der Abfolge der einzelnen Aminosäuren innerhalb eines Proteins, und der Ausbildung von Amino-Succinimiden (Asu) besser verstehen zu können, wurde von STEPHENSON *et al.* eine Reihe von synthetischen Hexapeptiden (Val-Tyr-Pro-X-Y-Ala) hinsichtlich ihrer Reaktionsrate bei einem pH-Wert von 7.4 untersucht. Diese Peptide beinhalteten Aspartyl, Asparaginyl und Aspartylmethylester an Position X, gefolgt von Glycyl, Seryl oder Alanyl-Resten an Position Y. STEPHENSON *et al.* konnten anhand dieser Peptide zeigen, dass die sequenzabhängige Succinimidbildung bei Peptiden mit einer Asparaginyl-Seitenkette 13-35 mal schneller abläuft als bei den analogen Aspartyl-Peptiden. Die Bildungsrate der Succinimide bei Glycyl-Peptiden war im Vergleich zu den Alanyl-Peptiden 6.5 bis 17.6 mal so schnell, während die Succinimidbildung bei Seryl-Peptiden um den Faktor 1.6 bis 4.5 schneller war als bei den Alanyl-Peptiden. Die gesamte Spanne der Bildungsrate der Succinimide von bis zu dem 232-fachen gegenüber der langsamsten Reaktion, zeigt dass die Primärstruktur von Peptiden eine maßgebliche Determinante in der Stabilität ist.^[98]

Weiterhin konnten STEPHENSON *et al.* anhand der untersuchten Peptide zeigen, dass die Bildung von Succinimiden die höchste Reaktionsgeschwindigkeit aufweist, wenn in C-Terminaler Richtung zum Succinimid ein Glycyl-Rest benachbart ist.^[98] In vorangegangenen Studien von BORNSTEIN *et al.* wurde als Grund für die einzigartige Reaktivität der Asn-Gly- bzw.

Asp-Gly-Sequenz das Fehlen einer Seitenkette in *C*-terminaler Richtung zum Succinimid und die dadurch mangelnde sterische Hinderung beim nukleophilen Angriff des Amid-Stickstoffs des Peptidrückgrates an den Carbonylkohlenstoff der Asparagin- oder Asparaginsäure-Seitenkette postuliert.^[99] Nach dieser Definition sollte sich eine theoretische Reaktivitätenreihenfolge bei steigenden sterischen Anspruch mit $\text{Asn-Leu} < \text{Asn-Ser} < \text{Asn-Ala} < \text{Asn-Gly}$ ergeben. Jedoch konnte durch die Experimente von STEPHENSON *et al.* gezeigt werden, dass lediglich das erste Kohlenstoffatom (C_β) der Seitenkette, *C*-Terminal zum Succinimid, den größten Einfluss hat. So reagierten Peptide mit einer Asn-Ser-Sequenz deutlich schneller zu Succinimiden als Asn-Ala beinhaltende Peptide. Weiterhin gab es deutlich kleinere Unterschiede in der Reaktionsgeschwindigkeit zwischen Asn-Leu und Asn-Ala, die sich um den Faktor 3.5 unterscheiden, als zwischen den Sequenzen Asn-Ala und Asn-Gly, die um den Faktor 17.6 auseinander lagen.^[98] Diese Ergebnisse machen deutlich, dass nicht nur die verminderte sterische Hinderung des Glycins alleine für die erhöhte Reaktivität bei der Ausbildung von Succinimiden verantwortlich ist. Ausschlaggebend ist die besondere Fähigkeit von Glycin, die Flexibilität des Peptidrückgrates zu steigern.^[100,101] Durch diese erhöhte Flexibilität können mehrere Konformationen des Peptidrückgrates eingenommen werden, die eine nucleophile Substitution des Amid-Stickstoffs an eine Asparagin- oder Asparaginsäure-Seitenkette begünstigen. Bei Peptiden die an dieser Position eine Aminosäure mit β -Kohlenstoffatom tragen, ist der Konformationelle Raum im Vergleich zum Glycin stark eingeschränkt, wodurch die Reaktionsgeschwindigkeit sinkt.^[98] Die Ergebnisse von STEPHENSON *et al.* zeigen jedoch auch, dass innerhalb von Proteinen eine noch größere Spanne in der Bildungsgeschwindigkeit von Succinimiden möglich ist, da spezifische Konformationen des Proteins solch eine Reaktion inhibieren oder auch verstärken kann. So konnten KOSSIAKOFF *et al.* durch ihre Untersuchungen an Trypsin zeigen, dass die Konformation und auch das Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerk eines Proteins und somit auch die Tertiärstruktur einen größeren Einfluss auf die Succinimidbildung und die daran anschließende Desamidierung haben, als die in *C*-terminaler Richtung benachbarten Aminosäuren zum Asparagin- bzw. Asparaginsäure-Rest. Des Weiteren konnte er aufklären, dass lediglich die Aminosäure in *C*-terminaler Richtung einen Einfluss auf die Desamidierung hat. Aminosäuren in *N*-terminaler Richtung beeinflussen diese Reaktion in keinem signifikanten Maß.^[98,102] Ein weiteres bemerkenswertes Detail bei KOSSIAKOFFS Untersuchungen ist die Tatsache, dass alle Asparagin-Seitenketten des Trypsins, die eine Desamidierung durchlaufen (Asn^{48} , Asn^{95} und Asn^{115}) in *C*-terminaler Richtung ein Seryl-Rest besitzen und sich innerhalb eines β -turns in der $i+2$ Position befinden. Kossioakoff postulierte, dass die Serin-Seitenkette eine Wasserstoffbrückenbindung zur eigenen Amidbindung ausbilden kann und dadurch die Deprotonierung dieser zu begünstigt.^[102,103] Die Deprotonierung des Amid-Stickstoffatoms ist essentiell für die Ausbildung eines Succinimid-Intermediates und der

anschließenden Desamidierung, da die Nukleophilie deutlich gesteigert wird.^[102-104] Ein weiterer Beweis für den starken Einfluss des Wasserstoffbrückenbindungsnetzwerkes auf die Ausbildung von Succinimiden zeigt sich ebenfalls innerhalb des Trypsins bei Asn³⁴. Auch dieses Asparagin besitzt in *C*-terminaler Richtung ebenfalls einen Seryl-Rest und befindet sich innerhalb eines β -turns, ist aber im Vergleich zu den oben genannten Asparagin-Resten (48, 95, 115) stabil und bildet kein Succinimid aus oder unterliegt einer Racemisierung bzw. Desamidierung. Der einzige Unterschied des Asparagins an der Position 34 ist, dass die nachfolgende Aminosäure mit dem Amid-NH sich innerhalb einer Wasserstoffbrückenbindung (WBB) zu dem Carbonyl der Aminosäure an Position 39 befindet. Die Ausbildung eines Succinimides an dieser Stelle hätte einen Bruch der WBB zur Folge und würde die Konformation in signifikantem Maße stören.^[102] Um ein besseres Verständniss über die Konformation von Succinimiden innerhalb eines Peptidrückgrates zu bekommen, wurden von MAZZARELLA *et al.* sowie CAPASSO *et al.* mehrere Di- und Tripeptide mit einem L-Amino-Succinimid anhand ihrer Kristallstrukturen und mit Hilfe der NMR- sowie CD-Spektroskopie untersucht (Boc-L-Asu-Gly-L-Ala-OMe, Z-L-Asu-L-Phe-NH₂, Boc-L-Leu-L-Asu-L-Phe-NH₂).^[105-108] Alle untersuchten Peptide zeigten in der Kristallstruktur die

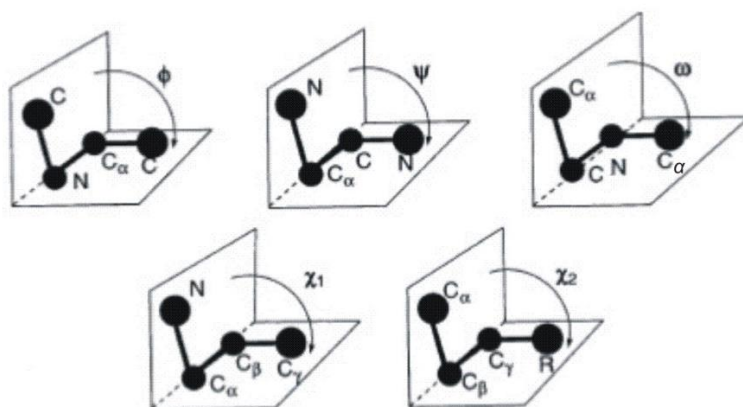


Abbildung 8: Übersicht über die Torsionswinkel von Peptiden. Der Torsionswinkel um die C_α-C-Bindung wird als Psi (ψ), der um die N-C-Bindung als Phi (ϕ) bezeichnet. Die Torsionswinkel ϕ und ψ sind 0, wenn die beiden planaren Amidgruppen in einer Ebene liegen. Entlang einer Aminosäureseitenkette werden die Torsionswinkel mit dem Buchstaben Chi (χ) bezeichnet.^[113]

Konformation eines β II'-turns^[109], bei dem sich der Succinimid-Ring an der *i*+2 Position befindet. Der Succinimid-Ring selbst liegt in den Peptiden nicht planar vor, sondern weist ein Puckering mit einer Amplitude von durchschnittlich 0.10 Å auf, mit der Suc-CH₂ Gruppe oder dem Suc- α oberhalb der Ringebene. Diese geringe Deformation des Ringes ist konsistent mit einer *envelope*

Konformation was zu einer Reduzierung der Wechselwirkungen zwischen den Substituenten an der Suc-CH₂ Gruppe und dem Suc- α führt, die sonst *ecliptisch* zueinander stehen würden. Auf der anderen Seite verringert das Puckering jedoch die Bindungsenergie der intramolekularen Wasserstoffbrückenbindung (2.8-3.1 Å)^[105], da durch die geringe Deformation der Abstand zwischen dem Amid in *N*-terminaler Richtung des Succinimides sowie dem Carbonyl in *C*-terminaler Richtung vergrößert wird (s. Abb. 9). Ist das Peptid nicht in der Lage diese

intramolekulare WBB auszubilden, führt dies zu einem deutlich stärkeren Puckering, was anhand des vollständig geschützten Peptides Boc-L-Asu-Gly-OMe von CAPASSO *et al.* gezeigt werden konnte.^[110,111] Auch wenn das Puckering bei allen Peptiden sehr gering ausfällt, hat es dennoch einen signifikanten Einfluss auf den Diederwinkel ψ (s. Abb. 8), der bei allen untersuchten Peptiden im Bereich von -108° bis -133° liegt. Trotz der Spanne von 25° , liegen diese Werte immernoch nahe des theoretisch vorhergesagten Wertes für einen $\beta II'$ -turn von -120° .^[112,113] Auch der Diederwinkel ω ist durch die stark eingeschränkte Konformation des Succinimid-Ringes auf Werte zwischen 170° und 177° beschränkt. Dies liegt ebenfalls in guter Übereinstimmung mit dem theoretischen Wert für einen $\beta II'$ -turn von 180° .^[105,108,112] Bemerkenswert hierbei ist, dass sich bei allen untersuchten Peptide ein L-Aminosuccinimid an der $i+2$ -Position befindet und selbst Aminosäuren mit großen sterisch anspruchsvollen Seitenketten wie Phenylalanin in der $i+3$ -Position keine negativen Auswirkungen auf die Konformation haben. In natürlich vorkommenden Peptiden ist diese Konformation des $\beta II'$ -turns mit einer L-Aminosäure an $i+2$ -Position nicht begünstigt und kommt hauptsächlich in linearen

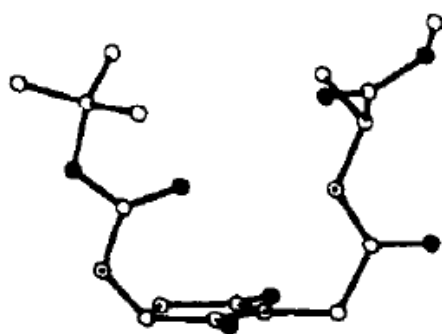


Abbildung 9: Kristallstruktur des geschützten Tripeptides Boc-L-Asu-Gly-L-Ala-OMe.^[113]

Peptiden mit einer D-Aminosäure in $i+2$ -Position vor, gefolgt von Glycin in der $i+3$ -Position. Die Ergebnisse von CAPASSO *et al.* konnten zeigen, dass L-Aminosuccinimide in der $i+2$ -Position einen stabilisierenden Effekt auf einen $\beta II'$ -turn besitzen, da der Succinimid-Ring einen Diederwinkel von $\psi = -120^\circ$ benötigt. Weiterhin befindet sich die Aminosäure in C -terminaler Richtung vom Succinimid immer in *trans* Konfiguration zum Succinimid-Ring, wodurch das Peptid in seiner konformativen Flexibilität stark eingeschränkt

ist. Diese Einschränkung der Flexibilität ist bei Succinimiden noch stärker ausgeprägt als bei Prolyl-Resten und bewirkt dadurch eine Stabilisierung der *turn*-Struktur.^[114] Weiterhin sind die beiden Bindungslänge zwischen dem Imid-Stickstoffatom und den beiden Carbonyl-Kohlenstoffen des Succinimides mit einem Wert von 1.374 \AA länger als eine normale Amid-Bindung innerhalb eines Peptides. Dieser Wert ist konsistent für alle Aminosuccinimid-Peptide und kann durch eine geringere π -Bindungsordnung der C-N-Bindung innerhalb des Ringes beschrieben werden.^[105]

Zusammenfassend lässt sich auf Grundlage der Experimente von MAZZARELLA *et al.* und CAPASSO *et al.* sagen, dass der Fünfring des Succinimides innerhalb eines Peptidrückgrates den konformationellen Raum stark einschränkt, wodurch sich der Schluss ziehen lässt, dass die Vororientierung der Seitenketten und die Konformation des Peptidrückgrates eine entscheidene Rolle bei der Zyklisierung des Asparagins oder der Asparaginsäure hin zum Succinimid spielen.

Durch die Bildung des Succinimid-Ringes wird die Amid-Bindung innerhalb des Ringes, die zum Peptidrückgrat gehört, in der *trans*-Konfiguration fixiert, genauso wie der Torsionswinkel ψ um die C_{α} -C-Bindung des Succinimides mit einem Wert von -120° , was eine Stabilisierung der Sekundärstruktur zur Folge hat.^[105]

Nur wenige Jahre nach Veröffentlichung der Ergebnisse von CAPASSO *et al.* zu Succinimiden in Peptiden konnte 1998 von SATOW *et al.* erstmalig die Kristallstruktur des Proteins Lysozym mit einem stabilen Amino-Succinimid aufgeklärt und die Konformation eines Succinimides

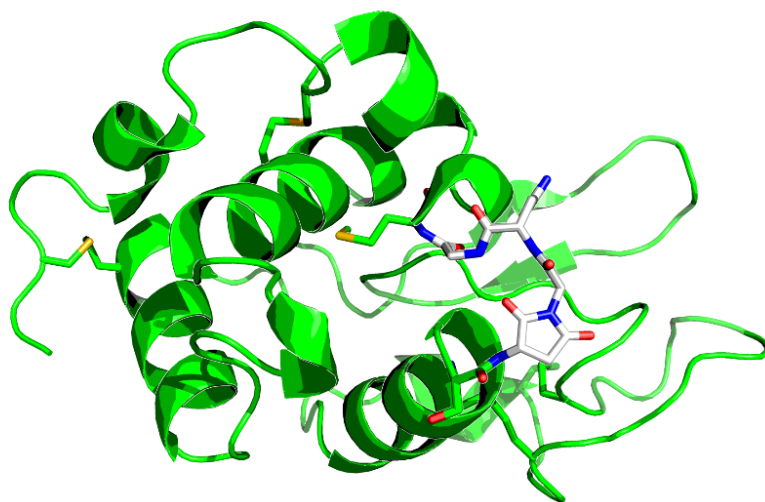


Abbildung 10: Erste bekannte Kristallstruktur des Hühnereiweiß-Lysozyms mit einem Succinimid an Position 101 (Tertiärstruktur: grün = β -sheet, α -Helix und loop; β II'-turn mit Succinimid: grau = Kohlenstoff, blau = Stickstoff, rot = Sauerstoff) PDB-Code: 1AT5.^[115]

innerhalb eines Proteins untersucht werden (s. Abb. 10).^[115]

Durch den nukleophilen Angriff des Amid-Stickstoffs des Glycins¹⁰² an dem Carbonyl-Kohlenstoff der Seitenkette der Asparaginsäure¹⁰¹ des Proteins wird das Succinimid gebildet.

Bemerkenswert hierbei ist, dass die Aminosäuren von

Asu¹⁰¹ bis Gly¹⁰⁴ genau wie schon in den Peptiden von CAPASSO *et al.* beschrieben, die Konformation eines β II'-turns einnehmen.^[105,111,112,115] Ein signifikanter Unterschied zu den Ergebnissen von CAPASSO ist jedoch, dass sich das Succinimid an der *i*+1 Position des turns befindet und durch eine Wasserstoffbrückenbindung (2.9 \AA) zwischen dem Carbonyl des Succinimides¹⁰¹ innerhalb des Peptidrückgrates und dem Amid-NH des Glycins¹⁰⁴ stabilisiert wird.^[115] Dieser Unterschied wird von SATOW auf die Verwendung von unpolaren Lösungsmittel für die Kristallisation und der daraus resultierenden anderen Umgebung sowie Konformation für die von CAPASSO und MAZZARELLA untersuchten Peptid zurückgeführt.^[115] In der Umgebung einer komplexen Tertiärstruktur ist die *i*+1-Position unter physiologischen Bedingungen für Succinimide bevorzugt. Die Bildung des Succinimides innerhalb des Lysozyms hat dabei weitreichende Veränderungen in der dreidimensionalen Struktur, den physikalischen Eigenschaften und der biologischen Funktion zur Folge. So besitzt es aufgrund des Wegfalls der Asparaginsäure-Seitenkette eine reduzierte Hydrophilie innerhalb der turn-Region (Asu¹⁰¹–Gly¹⁰⁴), was eine geringere Löslichkeit zur Folge hat. Auch die minimale Natriumchlorid-

konzentration für die Kristallisation ist ebenfalls deutlich geringer im Vergleich zum nativen Lysozym. Da das Succinimid wie schon von CAPASSO *et al.* beschrieben innerhalb des *turns* die Konformation eines $\beta II'$ -*turns* einnimmt und durch die Limitierung der Diederwinkel $\psi = -120^\circ$ und $\omega = 180^\circ$ stark in der Beweglichkeit eingeschränkt ist, führt dies zu einer Störung der Tertiärstruktur, wodurch im Vergleich zum nativen Lysozym drei WBB nicht ausgebildet werden können. Dies hat zur Folge, dass die Bindungsaffinität für Liganden an das Protein um den Faktor 5 sinkt. SATOW *et al.* nehmen an, dass die Succinimid-Bildung zur Regulierung der Proteinaktivität dient und nicht nur ein Teilprozess der Proteinalterung ist.^[115] Diese Annahme wurde durch die Untersuchungen der *Mathanocaldococcus jannaschii* sowie *Pyrococcus horikoshii* Glutaminase von BALARAM *et al.* gestützt.^[116] Es konnte gezeigt werden, dass durch die Präsenz eines Succinimides an der Position 109 der *jannaschii* Glutaminase (durch Desamidierung eines Asparagin-Restes) die strukturelle Rigidität des Proteins erhöht wird. Dies hat zur Folge, dass das Enzym mit einem Succinimid selbst bei 100 °C stabil, und selbst bei der Zugabe von 8 M Denaturierungsreagenzien wie Guanidinchlorid kein Effekt auf die Faltung der Tertiärstruktur feststellbar war. Im Vergleich dazu beginnt das native Enzym mit dem Asparagin-Rest an Position 109 bereits bei 85 °C sich zu entfalten und oberhalb von 100 °C setzt eine irreversible Zersetzung ein. Auch Hydrolyseexperimente mit stärkeren Nukleophilen wie Hydroxylamin zeigten, dass der Succinimid-Ring ungewöhnlich stabil ist. So konnte nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei einer Konzentration von 2 M Hydroxylamin bei 37 °C keine Öffnung des Imid-Ringes beobachtet werden. BALARAM *et al.* führen diese außergewöhnliche Stabilität des Succinimides auf eine evolutionäre Selektion dieser Sequenz zurück, die durch ihre übergeordnete Tertiärstruktur in der Lage ist das Succinimid vor Hydrolyse, selbst unter extremen aber dennoch physiologisch relevanten Bedingungen, zu schützen. Bei näherer Betrachtung der Kristallstruktur der *Pyrococcus horikoshii* Glutaminase (s. Abb. 11) ist zu erkennen, dass das Succinimid sich innerhalb eines *turns* befindet, der Teil eines *loops* ist, der ein antiparalleles β -Faltblatt verbindet.^[116] Dabei wird der Succinimid-Ring durch die Seitenkette der in C-terminaler Richtung benachbarten Glutaminsäure abgeschirmt, wodurch ein nukleophiler Angriff von Wasser nicht mehr möglich ist. Des Weiteren sind auch die benachbarten Reste D¹¹⁰, E¹¹¹, K¹¹⁶, L¹⁴² und Y¹⁶¹ die sich um das Succinimid herum befinden und eine Art Mikroumfeld bilden, innerhalb dessen das Enzym konserviert wird. Die wiederum trägt zur Hydrolysestabilität des Succinimides bei. Wie schon bei CAPASSO und SATOW führt das Succinimid aufgrund des limitierten Diederwinkels ψ mit einem Wert von -120° auch hier zu einer eingeschränkten Beweglichkeit des *turns* und dadurch zu einer veringerten Dynamik des gesamten *loops*.^[105,115,116] Am C- und N-terminalen Ende des β -Faltblattes befinden sich die Reste Tyr¹⁰¹ und Trp¹²⁵ die durch π -stacking die Sekundärstruktur stabilisieren und in WW mit den

Resten His¹⁶⁶ und Glu¹⁶⁸ des katalytischen Zentrums des Enzyms stehen. BALARAM *et al.* vermuten, dass durch die Ausbildung des Succinimides eine präzise Positionierung der Reste Tyr¹⁰¹ und Trp¹²⁵ durch eine gerichtete Dynamik des *loops* erreicht wird. Da die Aktivität des Enzyms von der Bindung des Ligandkomplexes MjATPPase abhängig ist und diese über die *loop* Dynamik gesteuert wird, ist die Bildung des Succinimides von elementarer Bedeutung um die Aktivität des Enzyms *Mathanocaldococcus jannaschii* Glutaminase auch bei Temperaturen oberhalb von 100 °C, wie es bei thermophilen Lebensformen der Fall ist, zu gewährleisten.^[116]

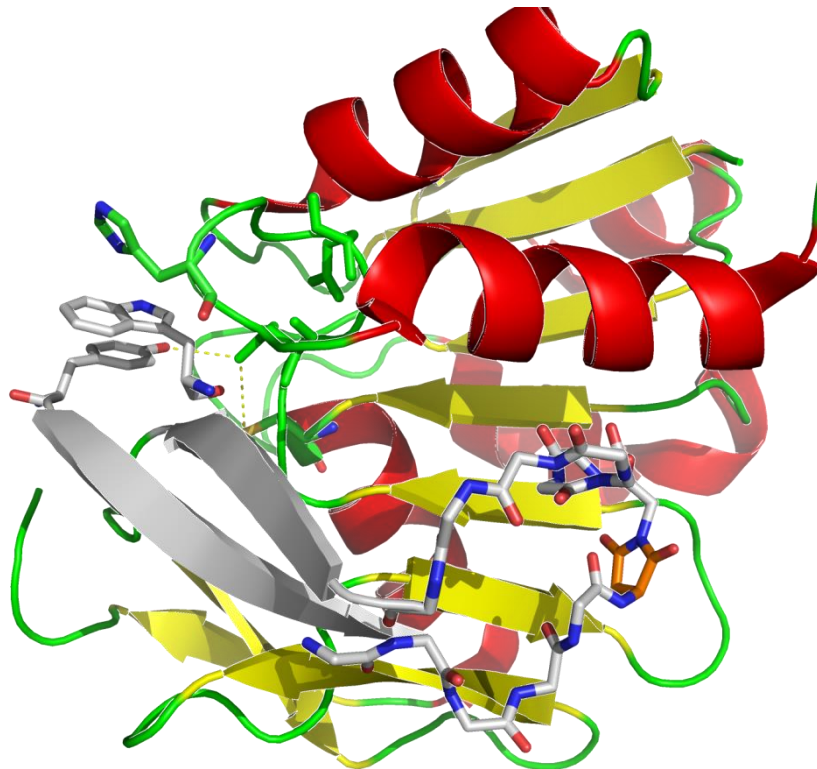


Abbildung 11: Kristallstruktur der *Pyrococcus horikoshii* Glutaminase (PDB-code: 1WL8). Das Succinimid¹¹² (orange, *sticks*) befindet sich innerhalb eines *turns*, der Teil eines *loops* (grau, *sticks*) ist, der ein antiparalleles β -Faltblatt verbindet. Am C- und N-terminalen Ende des β -Faltblattes (grau, *cartoon*) befinden sich die Reste (grau, *sticks*) Tyr¹⁰¹ und Trp¹²⁵ die durch π -stacking die Sekundärstruktur stabilisieren und in Wechselwirkung mit den Resten (grün, *sticks*) His¹⁶⁶ und Glu¹⁶⁸ des katalytischen Zentrums des Enzyms stehen. Das Succinimid hat Einfluss auf Stabilität und Aktivität des Enzyms.^[116]

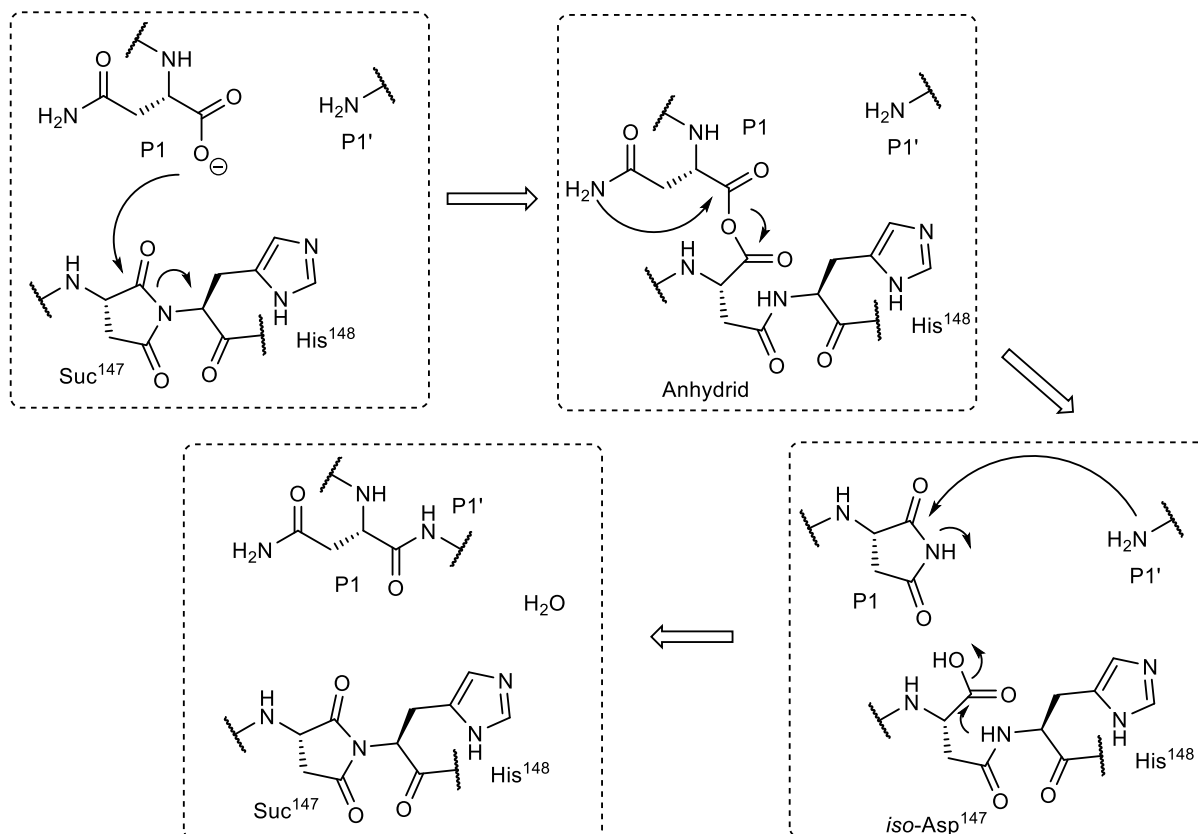
Diese Erkenntnis von BALARAM über Succinimide als Schutzmechanismus für die Aktivität von Enzymen ist ein neuer Schritt im Verständnis der Funktion dieser posttranslationalen Modifikationen und der Enzyme selbst. Dennoch sind bis heute nur sehr wenige Kristallstrukturen von Enzymen oder Proteinen bekannt, die ein Succinimid beinhalten und noch weniger Beispiele, bei denen dem Succinimid eine Relevanz in der biologischen Aktivität oder strukturellen Funktionen zugewiesen wird. In Tabelle 1 sind alle bis dato bekannten Kristallstrukturen zusammengefasst.

Tabelle 1: Zusammenfassung aller Kristallstrukturen von Proteinen mit einem Amino-Succinimid (Asu).

PDB-Code	Asu=Xaa	Protein/Enzym
1AT5	Asu=Gly	Lysozym
10EW/10EZ	Asu=Gly	Endothiapepsin
20WX	Asu=Gly	Amylomaltase
1WL8	Asu=Glu	Glutaminase
20MK	Asu=Gly	Pyrophosphokinase
1JBE	Asu=Gly	apo-CheY
3URJ/3URI/3URL	Asu=Gly	Endothiapepsin
1GVT/1GVU/1GVW/1GVV	Asu=Gly	Endothiapepsin
4N6N/4N6O	Asu=His	Legumain
4D3Z	Asu=His	Prolegumain
4DX3/4DXK	Asu=Cys	Mandelat Racemase

Neben der von BALARAM *et al.* beschriebenen Funktion des Succinimides als Schutzmechanismus um die Aktivität des Enzyms zu gewährleisten, konnten Studien von BRANDSTETTER *et al.* am humanen Legumain zeigen, dass die Bildung von Succinimiden als Energiespeicher genutzt werden kann und es dem Enzym so ermöglicht dieses Succinimid als pH- oder umgebungsabhängigen Schalter zu verwenden.^[117] Legumain ist eine Cysteinprotease, die in der Immunabwehr eine zentrale Rolle einnimmt.^[118,119] Neben der Proteaseaktivität besitzt Legumain auch eine Ligaseaktivität, die aber im Gegensatz zur Proteaseaktivität einen Mechanismus unabhängig vom Cystein in der aktiven Tasche aufweist. Besonders interessant dabei ist, dass die Proteasefunktion bei einem saurem pH-Wert dominiert, während die Ligase bei einem neutralem pH-Wert ihr Aktivitätsoptimum zeigt. Diese pH-Abhängigkeit der beiden gegensätzlichen Aktivitäten zeigt, dass die Lokalisierung des Enzyms über seine Funktion bestimmt. BRANDSTETTER *et al.* konnten 2015 erstmalig nachweisen, dass bei der Ligationsreaktion die Umwandlung eines energiereichen, metastabilen Succinimides zu Aspartat als endogenes Energiereservoir genutzt wird. Analog zu ATP treibt das Succinimid an der Position 147 die endergonische Peptidbindungssynthese energetisch an.^[117,120,121] Mechanistisch schlagen BRANDSTETTER *et al.* vor (s. Schema 17), dass das Carboxylat des C-Terminus des zu ligierenden Cystatin (hCE, P1 (Asn³⁹I)) das energiereiche Succinimid¹⁴⁷ nukleophil am Carbonylkohlenstoffatom, das sich innerhalb des Peptidrückgrates befindet, angreift. Über einen tetraedrischen Übergangszustand wird der Ring geöffnet und so eine aktivierte Carboxylsäure auf Position P1 als Anhydrid erhalten. Der als Anhydrid aktivierte C-Terminus von P1 könnte von einem nahen N-Terminus mit His¹⁴⁸ als katalytische Base über nukleophile Substitution angegriffen werden. Die Kristallstruktur von Legumain im Komplex mit Cystatin E

(PDB-code: 4N6N/4N6O) zeigt jedoch, dass der C-Terminus jedoch sterisch zu weit vom P1'-Nukleophil entfernt ist. Aus diesem Grund schlagen BRANDSTETTER *et al.* vor, dass es wahrscheinlicher ist, dass die Asparagin³⁹_I-Seitenkette von P1 den elektrophilen Kohlenstoff des Anhydrids angreift und so das *iso*-Aspatat¹⁴⁷ freisetzt. Durch diese Reaktionsabfolge wird ein weiteres Succinimid-Intermediat am P1-Asn³⁹_I generiert.



Schema 17: Postulierter Mechanismus für die Ligaseaktivität des humanen Legumain. Das Carboxylat des C-Terminus des zu ligierenden Cystatin E (hCE, P1 (Asn³⁹_I)) greift das energiereiche Succinimid¹⁴⁷ nukleophil am Carbonylkohlenstoffatom, das sich innerhalb des Peptidrückgrates befindet, an. So wird eine aktivierte Carboxylsäure auf Position P1 als Anhydrid erhalten. Im nächsten Schritt greift der Carboxamid-Stickstoff der P1-Asn³⁹_I-Seitenkette den elektrophilen Kohlenstoff des Anhydrids an. Der so generierte Succinimid-Ring an der P1-Position wird dann über eine nukleophile Substitution des P1'-Stickstoffs geöffnet. Dabei wird die intakte P1-P1'-Peptidbindung dargestellt. Zeitgleich wird das Succinimid¹⁴⁷ über eine Kondensationsreaktion regeneriert.^[117]

Dieser Succinimid-Ring an der P1-Position wird dann über eine nukleophile Substitution des P1'-Stickstoffs geöffnet. Dabei wird die native P1-P1'-Peptidbindung dargestellt. Zeitgleich wird das Succinimid¹⁴⁷ über eine Kondensationsreaktion regeneriert.^[117] Durch Mutationsexperimente (D147S) konnten sie weiterhin beweisen, dass Asp¹⁴⁷ und somit die Möglichkeit zur Ausbildung eines Succinimides elementar für die Ligaseaktivität ist, aber nicht für die Proteasefunktion.^[117]

Die Beschreibung von BRANDSTETTER *et al.* des konjugierten Asparaginsäure-Succinimid-Paares stellt eine neue Möglichkeit eines intrinsischen Energiereservoirs dar, um in ATP-armen Umgebungen wie z.B. im extrazellulären Raum, endergone Reaktionen zu katalysieren.^[117]

Auch wenn BALARAM und BRANDSTETTER zeigen konnten, dass Succinimide eine biologisch wichtige posttranslationale Modifikation sind und wesentlich zur Steuerung der Enzymaktivität beitragen, stellen sie sogleich auch sehr labile Intermediate dar, die jenseits des Schutzes einer Tertiärstruktur, wie im Falle von Legumain, *Mathanocaldococcus jannaschii* Glutaminase und *Pyrococcus horikoshii* Glutaminase, gerade an der Oberfläche von Proteinen in den Bereichen von *loops* leicht epimerisieren und hydrolysieren können.

Wie bei der SPPS, kann auch bei posttranslational modifizierten Proteinen das Stereozentrum des Succinimids **58** aufgrund seiner erhöhten Acidität durch Enolisierung epimerisieren, wodurch zwei Diastereomere gebildet werden.^[96,122,123] Diese Enolisierung kann sowohl im Basischen als auch bei saurem pH-Wert auftreten. Durch einen anschließenden nukleophilen Angriff von Wasser kann das racemische Succinimid **59** an zwei verschiedenen Stellen geöffnet werden. Dabei entsteht sowohl das racemische α -Peptid **60** mit einer Aspartyl-Seitenkette als auch das racemische β -Peptid mit einem *iso*-Aspartyl-Rest **61** innerhalb des Peptidrückgrates (s. Schema 16).^[94,116] Unter neutralen bis basischen Bedingungen ist die Hydrolyse von Amino-Succinimiden (Asu) deutlich schneller als deren Bildung.^[124,125] Bei einem pH-Wert zwischen 4 und 5, der auch typisch für Protein Formulierungen in der biochemischen und pharmazeutischen Industrie ist, ist die Ausbildung von Asu, ausgehend von Aspartyl- oder *iso*-Aspartylresten, schneller als die Hydrolyse, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen Bildung und Hydrolyse einstellen kann und signifikante Mengen des Succinimides gebildet werden können.^[94,126] Erste Untersuchungen zur Bildung und anschließenden Hydrolyse von Succinimiden wurde bereits 1987 von CLARKE *et al.* anhand von synthetischen Modell-Hexapeptiden (Val-Tyr-Pro-Xaa-Gly-Ala; Xaa = Asn, Asp) bei 37 °C und physiologischem pH-Wert (7.4) durchgeführt.^[127] Sie konnten zeigen, dass das Hexapeptid mit Asparagin unter diesen Bedingungen eine sehr schnelle Desamidierung durchläuft und eine Halbwertszeit von 1.4 Tagen für die Bildung des Succinimides besitzt. Die anschließende Hydrolyse des Succinimides hat eine Halbwertszeit von nur 2.3 Stunden. Durch den Austausch von Asparagin gegen Asparaginsäure wird die Reaktion zur Bildung des Succinimides um den Faktor 34 verlangsamt. Vier Jahre später wurde die Bildung und Hydrolyse von Succinimiden, ausgehend von einer Asparagin-Seitenkette (Desamidierung), systematisch von SCHIRCH *et al.* im Bezug auf den Einfluss der benachbarten Aminosäuren, des pH-Wertes und der Ionenstärke untersucht.^[128] Für diese Studien wurden Pentapeptide mit den Sequenzen Val-Ser-Asn-Xaa-Val bzw. Val-Xaa-Asn-Ser-Val mit Xaa = Gly, His, Ser, Asp, Ala, Arg, Leu, Thr, Ile oder Val verwendet. Diese können auf Grund

ihrer Reaktionsraten für die Gesamtreaktion der Desamidierung bei der Verwendung eines 20 mM Kaliumphosphatpuffers mit pH = 7.3 und einer Temperatur von 60 °C in drei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe besitzt eine Halbwertszeit von weniger als 10 Stunden. Wie schon CLARKE *et al.* zeigen konnten unterliegt auch hier die Asn-Gly Sequenz einer sehr schnellen Desamidierung mit einer Halbwertszeit von nur 5.8 Stunden.^[127,128] Die zweite Gruppe mit Xaa = Ile, Leu, Thr, Val hat die langsamsten Raten mit Halbwertszeiten von mehr als 200 Stunden und sind damit 40- bis 70-mal langsamer als die Asn-Gly Sequenz. Da es sich um β -verzweigte bzw. im Falle von Leucin um γ -verzweigte Aminosäuren handelt, stehen diese Ergebnisse auch im Einklang mit den Beobachtungen von STEPHENSON *et al.*^[98] Die dritte Gruppe mit Xaa = Ala, Asp, His, Arg, Ser liegt im Mittel mit Halbwertszeiten von 25 bis 75 Stunden. Interessant hierbei ist, dass diese Aminosäuren unter den gegebenen Reaktionsbedingungen unterschiedliche Ladungen in den Seitenketten tragen. Dennoch sind die Reaktionsraten vergleichbar und liegen dicht beieinander.^[128]

Werden diese Ergebnisse mit denen von STEPHENSON *et al.* verglichen zeigt sich, dass die Bildung des Succinimides der geschwindigkeitsbestimmende Schritt in der Desamidierung ist. Dies gilt im Falle von Asparagin jedoch nur bei einem pH-Wert zwischen 5 und 14. Nur in diesem Bereich werden beide möglichen Hydrolyseprodukte des Succinimides, Asp und *iso*-Asp, beobachtet. Bemerkenswert hierbei ist die Tatsache, dass das Verhältnis von Asp zu *iso*-Asp nach der erfolgten Desamidierung bei allen untersuchten Peptiden von SCHIRCH *et al.* bei 1:3 lag. Dies bestätigt auch vorangegangene Studien von MEINWALD *et al.* und CLARKE *et al.* und zeigt, dass die Primärstruktur keinen Einfluss auf den Mechanismus der Hydrolyse hat, da sich das Verhältnis nie ändert.^[129,130] Bei einem pH-Wert unterhalb von 2 wird jedoch nur noch Asp als Desamidierungsprodukt gefunden. Grund hierfür ist eine direkt Hydrolyse der Asparagin-Seitenkette ohne die Ausbildung des intermediären Succinimides.^[124,128,129] Dies hat zur Folge, dass im sauren pH-Bereich die Reaktionsgeschwindigkeit nicht mehr von der Primärstruktur eines Peptides oder Proteins abhängt. Zur Bestätigung dieser Annahme wurden von SCHIRCH *et al.* drei Peptide untersucht, die sich bei pH = 7.3 in ihren Halbwertszeiten stark unterschieden (VSNGV: $t_{1/2}$ = 5.8 h, VSNAV: $t_{1/2}$ = 62 h, und VSNIV: $t_{1/2}$ = 330 h). In einer 0.1 M HCl-Lösung zeigten die Peptide nahezu identische Halbwertszeiten von 39, 44 und 40 Stunden und ausschließlich die Bildung von Asp als Hydrolyseprodukt.^[128] Weiterhin war es SCHIRCH *et al.* möglich die bereits von KOSSIAKOFF getroffene Annahme, ein in C-terminaler Richtung zum Asparaginsäure- bzw Asparagin-Rest benachbarter Seryl-Rest begünstigt und beschleunigt die Succinimid-Bildung, zu bestätigen.^[102,128]

An Proteinen konnte zuvor gezeigt werden, dass das Hauptprodukt der Hydrolyse von Succinimiden wie auch bei den Peptiden das *iso*-Aspartat ist. Jedoch schwankt das Verhältnis der Hydrolyseprodukte von Asp/*iso*-Asp zwischen 1:3 und 1:5,^[103,130] wohingegen das Verhältnis

bei synthetischen Peptiden konstant bei 1:3 liegt. Eine Ausnahme bildet hierbei das Protein H15D HPr, dass ausschließlich Aspartat als Hydrolyseprodukt hervorbringt.^[131] Um den Einfluss der Proteinstruktur auf das Verhältnis der Succinimid-Hydrolyseprodukte näher zu untersuchen wurden von NAPPER *et al.* Studien an dem Protein H15D HPr durchgeführt.^[129–131] Für die Bildung eines *iso*-Aspartates ist es nötig, dass ein Wassermolekül nukleophil an dem Carbonyl des Succinimides angreift, das sich innerhalb des Peptidrückgrates befindet. In dem HPr Protein wird dieser Angriff durch die sterische Hinderung der C-terminale Glutaminsäure-Seitenkette (Glu⁸⁵) verhindert. Durch gezielte Mutation des Proteins wurde von NAPPER *et al.* dieser Glutaminsäurerest entfernt (H15D Δ 85 HPr). Diese Mutation behielt ihre Tertiärstruktur und biologische Aktivität, jedoch wurde nun auch das *iso*-Aspartat als Hydrolyseprodukt gefunden. Dieses Beispiel zeigt, wie schon bereits zuvor bei BRANDSTETTER *et al.* und SATOW *et al.* beschrieben, dass die Proteinstruktur einen großen Einfluss auf die Stabilität des Succinimides hat.^[115,117,131]

Diese Stabilität oder auch Labilität der Succinimide spielt in der Aufbereitung von Antikörpern und der Formulierung von Proteinen eine große Rolle. Studien von YAN *et al.* zur Untersuchung der Succinimid-Bildung an rekombinanten monoklonalen Antikörpern (mAb) des Typs IgG1 zeigten, dass durch die Ausbildung eines Succinimides an der Position Asn⁵⁵ der CDR-Region zu einer Reduzierung der biologischen Aktivität von 70% sowie der Ligandenbindung um 50% führte. Diese Succinimid beinhaltenden Antikörper kommen als stabile Intermediate mit einer Halbwertszeit von 3 Stunden bei 37 °C und einem pH-Wert von 7.6 vor. Leicht saure Bedingungen bei einem pH-Wert von 5 führten zu einer weiteren Akkumulierung der Succinimid-Spezies, was einen weiteren Verlust der Wirksamkeit zur Folge hat. Die Hydrolyse des Succinimides resultiert in einem weiteren Verlust der biologischen Aktivität.^[132]

Dass die Succinimid-Bildung und anschließende Hydrolyse innerhalb von Proteinen auch eine physiologische Relevanz besitzt, zeigt das Vorhandensein des Enzyms L-*iso*-Aspartylmethyltransferase (PIMT), welches spezifisch in den meisten Aminosäuresequenzen *iso*-Aspartyl- und D-Aspartyl-Reste erkennen kann und in nahezu allen prokariotischen und eukariotischen Organismen zu finden ist. Dieses Enzym katalysiert den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf die α -Carboxylgruppe des *iso*-Aspartat-Restes oder der β -Carboxylgruppe einer D-Asparaginsäure-Seitenkette. Diese Methylierung begünstigt die Bildung eines Succinimides, dass dann wiederum zum L-Asparat hydrolysiert werden kann. Dieser Reparaturmechanismus ermöglicht es, fehlerkonfigurierte Aspartate und *iso*-Aspartate vollständig umzuwandeln.^[131,133–135]

1.4 Strukturaufklärung von Peptiden mittels NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie nimmt unter den Methoden zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Biopolymeren wie Proteinen und Nucleinsäuren, neben Röntgenbeugungsexperimenten, eine einzigartige Stellung ein.^[136,137]

Setzen Röntgenbeugungsexperimente das Vorhandensein von Einkristallen voraus, die für kleinere Peptide und Miniproteine nur sehr schwer zu erhalten sind, so können mit Hilfe der NMR-Spektroskopie atomar aufgelöste Strukturen auch in Lösung ermittelt werden. Gerade im Bezug auf Enzyme oder Proteine ist dies ein großer Vorteil, da durch Anpassung der Temperatur, des pH-Wertes oder des Salzgehaltes, *in vitro* Bedingungen simuliert werden können. Des Weiteren ist die NMR-Spektroskopie nicht nur auf die Strukturbestimmung beschränkt, sondern schließt die Untersuchung dynamischer Prozesse von Molekülstrukturen ebenso ein, wie die strukturellen, thermodynamischen und kinetischen Aspekte der Wechselwirkung zwischen Proteinen und anderen Komponenten einer Lösung.^[137]

Besonders im Hinblick auf die in dieser Arbeit untersuchten β -hairpin Peptide mit einer maximalen Größe von 30 Aminosäuren stellt die NMR-Spektroskopie ein wichtiges Werkzeug zur Bestimmung der Sekundärstrukturen dar. Voraussetzung zur vollständigen Strukturaufklärung ist jedoch die korrekte und eindeutige Signalzuordnung.

Ein erster, sehr wichtiger Parameter zur Strukturaufklärung ist die durch GUTOWSKY *et al.* sowie HAHN und MAXWELL erstmalig beschriebene indirekte, skalare *spin-spin*-Kopplung.^[138,139] Da diese Kopplung über die Bindungselektronen vermittelt wird, liefert sie durch die Konnektivität der koppelnden Kerne eine wichtige Information über die Konstitution der Moleküle. Die Größe J einer Kopplungskonstante hängt dabei nicht nur von der Anzahl der Bindungen ab, die zwischen den koppelnden Kernen liegt, sondern auch von der Elektronenkonfiguration und räumlichen Anordnung der Kerne.^[140] Viele J -Kopplungen zeigen eine deutliche Abhängigkeit von Diederwinkeln und können daher Informationen über diese wichtigen Konformationsparameter liefern. Besonders ausgeprägt ist dieser Zusammenhang bei $^3J_{H,H}$ -Kopplungen, die über die KARPLUS-Beziehungen^[141,142] mit den entsprechenden Diederwinkeln korreliert sind (s. Abbildung 13). Wichtigstes Beispiel hierfür ist die $^3J_{NH,H\alpha}$ -Kopplung in Aminosäuren mit dem Konformationswinkel ϕ .^[140] Die Größe der Kopplungskonstante ist im Gegensatz zur chemischen Verschiebung unabhängig vom äußeren Magnetfeld und gibt im speziellen Fall der Strukturaufklärung von Peptiden Aufschluss über die Rückgratkonformation. Basierend auf der Auswertung von 85 hoch aufgelösten Proteinstrukturen, konnte von DOBSON *et al.* gezeigt werden, dass eine relativ große Kopplungskonstante für die $^3J_{NH,H\alpha}$ -Kopplung von etwa 9.0 Hz typisch für ein gestrecktes

Rückgrat ist, welches in β -Faltblätter zu finden ist. Die Kopplungskonstanten für ein paralleles β -Faltblatt ist dabei durchschnittlich 9.7 Hz größer als die für ein antiparalleles mit einem gemitteltem Wert von 8.9 Hz. Liegt der gemittelte Wert im Bereich von 3.9 – 5.6 Hz, deutet dies auf eine helikale Struktur (α -Helix, 3_{10} -Helix) hin.^[143] Eine weitere bedeutende Kopplungskonstante ist die $^3J_{H\alpha,H\beta}$ -Kopplung. Sie steht im direkten Zusammenhang mit dem Aminosäureseitenkettenwinkel χ_1 (vgl. Abb. 11) und gibt dadurch Aufschluss über die Rotamerenverteilung einer Seitenkette. Treten bei zwei $^3J_{H\alpha,H\beta}$ -Kopplungskonstanten jeweils Werte von < 4 Hz auf, befinden sich beide β -Protonen bevorzugt *gauche* zum H_α , was einem χ_1 -Winkel von 60° entspricht. Besitzt eine Kopplungskonstante einen Wert von > 10 Hz und eine < 4 Hz deutet dies auf einen Winkel χ_1 von 180° oder -60° hin (s. Abb. 12).^[144]

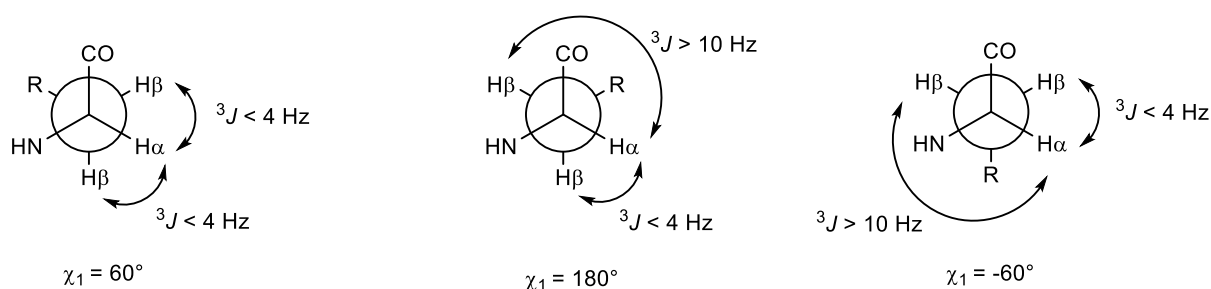


Abbildung 12: Schematische Darstellung der möglichen H_β -Rotamere einer L-Aminosäure mit den dazugehörigen $^3J_{H\alpha,H\beta}$ -Kopplungskonstanten und dem daraus resultierenden Seitenkettentorsionswinkel χ_1 .^[144]

Auf der skalaren Kopplung der Kerne beruhen auch die meisten 2D-NMR-Experimente wie COSY, TOCSY und HSQC, die es ermöglichen eine vollständige und korrekte Zuordnung der Signale aller Protonen innerhalb eines Peptides zu erreichen. Diese Experimente werden im Folgenden näher erläutert.

COSY (Correlation Spectroscopy): Bei einem COSY-Experiment werden die skalaren $^2J_{X,X}$ - und $^3J_{X,X}$ -Kopplungen gleicher Kerne, in der Regel die von Protonen, miteinander korreliert. Das Spektrum zeigt bezüglich der Diagonalen des Spektrums einen symmetrischen Aufbau, da beide Frequenzdomänen die gleiche Verschiebungsinformation enthalten. Die Kreuzsignale des COSY-Spektrums geben Aufschluss darüber, welche *spin-spin*-gekoppelten Kerne sich in *geminaler* oder *vicinaler* Nachbarschaft zueinander befinden (s. Abbildung 13).^[145,146]

TOCSY (Total Correlated Spectroscopy): Im TOCSY-Spektrum werden, ähnlich wie im COSY-Spektrum, gleiche Kerne über ihre skalaren Kopplungen miteinander korreliert. Allerdings erfolgt der Magnetisierungstransfer in Abhängigkeit der *spin-lock*-Zeit und der Größe der $^1H,^1H$ -Kopplungen über alle Kerne innerhalb eines Spinsystems (vgl. Abbildung 13) und ist somit nicht auf 2J - oder 3J -Kopplungen beschränkt. Dadurch lassen sich aus einem TOCSY-Spektrum

skalar miteinander koppelnde Kerne, die weiter als drei Bindungen voneinander entfernt sind, ohne Intensitätsverlust der Signale bei steigender Kopplung, identifizieren. Diese Eigenschaft des TOCSY-Experimentes ist insbesondere für Biopolymere wie Peptide, Proteine und Polysaccharide interessant, da jede Aminosäure innerhalb eines Peptides durch die Peptidbindungen bzw. jede Monomereinheiten eines Polysaccharides durch die glykosidische Bindung, ein separiertes Spinnssysteme darstellt. Im Falle von Peptiden oder Proteinen lassen sich so, ausgehend vom Amidproton, leicht alle Signale der jeweiligen Aminosäure zuordnen.^[145,146]

HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence): Mit Hilfe eines HSQC-Experimentes lässt sich im Gegensatz zu den vorangegangenen NMR-Methoden die Korrelation zwischen verschiedenen Kernen über ihre $^1J_{X,Y}$ -Kopplung detektieren. Im HSQC-Spektrum wird in der Regel auf der x-Achse die ^1H - und auf der y-Achse die ^{13}C -Verschiebung aufgetragen. Für die Signalzuordnung in Peptiden sind die ^{13}C -Verschiebungen sehr charakteristisch, da sie weniger stark von Änderungen in der Konformation oder durch Lösungsmittelleffekte beeinflusst werden als die chemische Verschiebungen der Protonen. Die entsprechenden Kreuzsignale der $^1J_{\text{C,H}}$ -Kopplung geben die direkte Konnektivität eines Protons zum dazugehörigen Kohlenstoff an.^[145]

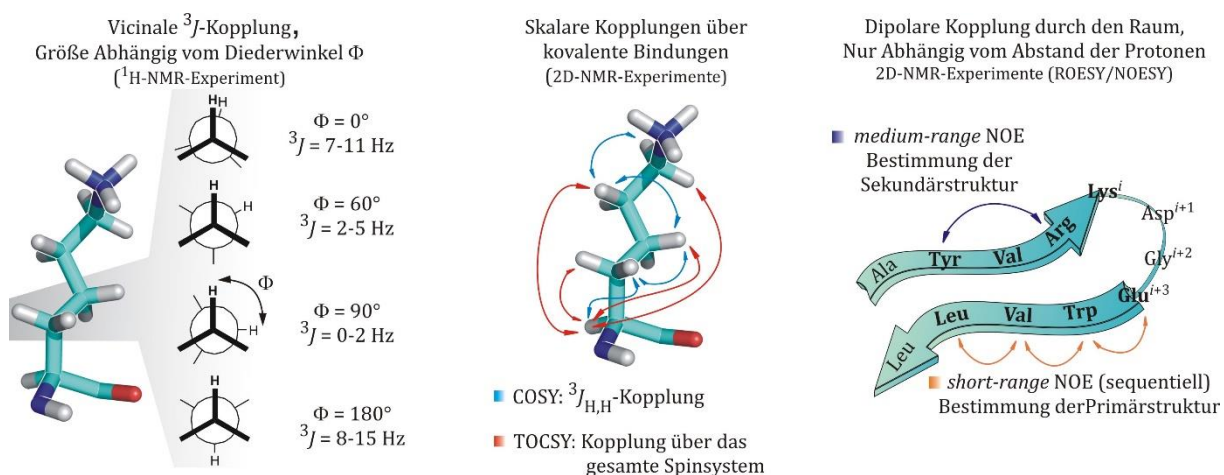


Abbildung 13: Schematische Darstellung von relevanten Parametern, die für die Strukturaufklärung von Peptiden und Proteinen notwendig sind. Die indirekte, skalare *spin-spin*-Kopplung der Kerne, die über die Bindungselektronen vermittelt wird, liefert durch die Konnektivität der koppelnden Kerne eine wichtige Information über die Konstitution der Moleküle.^[140] Die $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplungen stehen über die KARPLUS-Beziehungen^[141,142] im direkten Bezug zum Diederwinkel ϕ . Das COSY-Experiment erfasst skalare $^3J_{\text{H,H}}$ -Kopplungen zwischen *geminalen* oder *vicinalen* diastereotop aufgespaltenen Protonen. Beim TOCSY-Experiment werden die skalaren Kopplungen über das gesamte isolierte Spinsystem einer Aminosäure, das durch die Amidbindung innerhalb eines Peptides begrenzt ist, gemessen.^[145,146] Zur Verifizierung der Primär- sowie Sekundärstruktur werden in dem NOESY-Experiment bindungsunabhängige, dipolare Kopplungen gemessen.

Diese Experimente ermöglichen eine eindeutige Zuordnung der Signale aber geben noch keinen Aufschluss über die räumliche Struktur von Peptiden. Um die Primär- sowie Sekundärstruktur bestimmen zu können werden mit Hilfe des NOESY-Experimentes dipolare Kopplungen bestimmt.

NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy): Bei dem NOESY-Experiment werden im Gegensatz zu den vorangegangenen NMR-Methoden keine skalaren sondern dipolare Kopplungen zweier gleicher Kerne durch den Raum gemessen. Der Magnetisierungstransfer der dipolar koppelnden Kerne ist dabei unabhängig von den Bindungen die zwischen den beiden Kernen liegen. Dabei ist der Abstand r zwischen den beiden Kernen entscheidend für die Signalintensität I , da diese umgekehrt proportional mit der sechsten Potenz des Abstandes r abnimmt ($I \sim r^{-6}$). Durch diesen Zusammenhang können nur NOE-Signale zwischen zwei Kernen

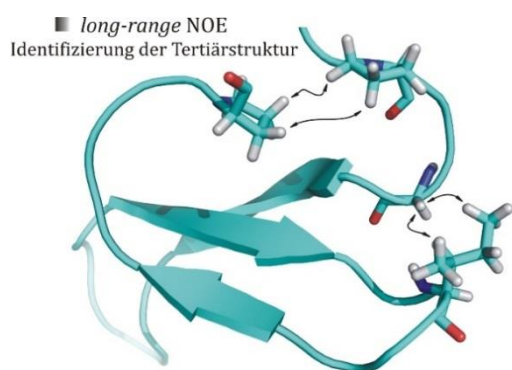


Abbildung 14: long-range NOE-Kontakte geben Aufschluss über die Tertiärstruktur von Proteinen.

detektiert werden, die sich in einen Abstand von weniger als 4-5 Å befinden. Durch die Quantifizierung der Signalintensität anhand eines starken Referenzsignals von Protonen mit einem bekannten Abstand, in der Regel diastereotope Methylengruppen (~ 1.8 Å) oder *vicinale* aromatische Protonen, können die NOE-Kontakte zum Erstellen eines Strukturmodells dienen und Aufschluss über die räumliche Geometrie eines Peptides oder Proteins liefern. Die NOE-Kontakte können noch weiter unterteilt werden, in

sequenzielle (*short-range*), *medium-range* oder *long-range*. Sequenzielle NOE-Kontakte dienen zur Aufklärung der Primärstruktur eines Peptides. Hierbei besitzt das H_{α} -Proton einer Aminosäure in der Position n einen Kontakt zum NH der Aminosäure in $n+1$. Kontakte der Aminosäure in n -Position zu $n+2$ bis $n+4$ werden als *medium-range* NOE bezeichnet und geben Aufschluss über die Sekundärstruktur. Noch weiter reichende Kontakte, wie die *long-range* NOEs (s. Abbildung 14) geben schlussendlich Auskunft über die Tertiärstruktur von Proteinen.^[145] Allerdings hängt die NOESY-NMR-Spektroskopie von der molekularen Beweglichkeit ab, wodurch ein Vorzeichenwechsel der Signalintensität in Abhängigkeit der Molekülgröße auftritt. Daher wird bei einem Molekulargewicht von etwa 500 g/mol der sogenannte „Nulldurchgang“ beobachtet. In dem Bereich des Nulldurchgangs entspricht die *tumbling*-Rate der Frequenz des Spektrometers. Dies hat zur Folge, dass die dipolaren Kopplungen von Molekülen dieser Größenordnung äußerst klein oder nicht detektierbar sind. Um das Problem des Nulldurchgangs zu umgehen kann die ROESY-NMR-Spektroskopie

(*Rotating Frame NOE-Spectroscopy*) angewandt werden. Diese auf der Pulsfolge des TOCSY-Experimentes basierende Messmethode ist weder von der Beweglichkeit der Moleküle noch von deren Molekulargewicht abhängig und bietet dadurch eine wichtige Ergänzung zum NOESY-Experiment. Allerdings können bei der Messung von ROESY-NMR-Spektren TOCSY- und auch COSY-Artefakte auftreten.

Ein weiteres wichtiges Werkzeug zur Bestimmung der Sekundärstruktur von Peptiden ist die Identifizierung von Wasserstoffbrückenbindungen. Hierzu macht man sich den Umstand zu nutze, dass Amidprotonen im ^1H -NMR-Spektrum eine deutliche Temperaturabhängigkeit in ihrer chemischen Verschiebung aufweisen.^[147] Die Resonanzsignale werden dabei mit zunehmender Temperatur hochfeldverschoben, was einem negativen Temperaturkoeffizienten $\Delta\delta/\delta T < 0$ entspricht. Der Grund für diese Temperaturabhängigkeit der Amidprotonen liegt in ihrer Beteiligung an Wasserstoffbrückenbindungen mit dem umgebenen Solvens oder einer gegenüberliegenden Carbonylgruppe als Wasserstoffakzeptor.^[148] Zur Identifizierung von amidischen Protonen, die sich innerhalb einer Wasserstoffbrückenbindung befinden, werden ^1H -NMR-Spektren bei unterschiedlichen Temperaturen gemessen und die Temperaturabhängigkeit der NH-Signale in ppb/K bestimmt.^[147] Dabei zeigten detaillierte Studien an Proteinen und hochvernetzten Peptiden, dass amidische Protonen, die wasserstoffbrückengebunden zu einem Carbonyl sind, charakteristischerweise einen Temperaturkoeffizienten von -2 ppb/K aufweisen.^[149,150] Amidische Protonen, die Wasserstoffbrücken zum Lösungsmittel und nicht intramolekular zu einem Protonenakzeptor ausbilden, zeigen mit Werten von -5 bis -10 ppb/K eine höhere Temperaturabhängigkeit basierend auf der frei werdenden Entropie.^[149,151] Diese Werte sind jedoch stark vom verwendeten Lösungsmittel und der räumlichen Struktur sowie der Größe des Peptides oder Proteins abhängig, wodurch viele Ausnahmen für diese generellen Aussagen existieren.^[150] So konnten KESSLER *et al.* bei der Untersuchung von cyclischen Peptiden zeigen, dass bei der Verwendung von DMSO als Lösungsmittel von intramolekularen Wasserstoffbrücke ausgegangen werden kann, wenn der Temperaturgradient einen Wert von ungefähr -2 ppb/K aufweist.^[149] Erhöht sich die Abhängigkeit der Temperatur, wird ab einem Wert von -4 ppb/K eine Orientierung des amidischen Protons hin zum Lösungsmittel wahrscheinlicher.^[149] In wässrigen Lösungen verschieben sich diese Grenzen nach oben und es kann noch bei einem Temperaturgradienten von -4 ppb/K von einer intramolekularen Wasserstoffbrücke ausgegangen werden.^[150,152] Am verlässlichsten ist die Bestimmung des Temperaturkoeffizienten zur Identifikation der Sekundärstruktur in β -turns, β -Faltblattstrukturen und 3_{10} -Helices.^[148] Dennoch zeigen sich in der Literatur große Abweichungen und die $\Delta\delta/\Delta T$ -Werte

schwanken gerade bei partiell ungefalteten, kleineren Peptiden aber auch bei Proteinen von -28 bis +12 ppb/K.^[150]

Ein weiterer Ansatz, die Sekundärstrukturen von Proteinen oder Peptiden zu identifizieren ist die Bestimmung von CSD-Werten (*chemical shift deviation*). Für unstrukturierte Peptide ohne jeglich Sekundärstruktur (*random coil*) ist lange bekannt gewesen, dass die chemischen Verschiebungen der Aminosäuren kaum von ihren benachbarten Resten beeinflusst werden.^[153] MARKLEY *et al.* sowie NAKAMURA *et al.* konnten in den 1960er Jahren durch Untersuchungen an Oligopeptiden jedoch zeigen, dass die chemischen Verschiebungen, insbesondere von $^1\text{H}_\alpha$ aber auch durch spätere Experimenten nachgewiesen $^{13}\text{C}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\beta$, $^1\text{H}_\text{N}$ und ^{15}N , stark mit der Sekundärstruktur von Peptiden korrelieren.^[154–156] Dabei zeigen die Resonanzsignale in β -Faltblattstrukturen einen klaren Trend zur Tieffeldverschiebung wohingegen α -Helices und *turn*-Strukturen eine Hochfeldverschiebung relativ zu den *random coil* Werten aufweisen.^[157,158] Grund für diese Änderungen in der chemischen Verschiebung, abhängig von der Sekundärstruktur, sind Veränderungen der ϕ und ψ Winkel des Peptidrückgrates, sowie lokale Rückgratrestrictionen durch aromatische Aminosäureseitenketten und der damit einhergehende *ring current effect*.^[159–161] Darauf basierend konnte DELGARNÓ *et al.* erstmals nachweisen, dass die charakteristische chemische Verschiebung einer Sekundärstruktur die Differenz zwischen dem beobachteten Wert eines Protons und dem *random coil* Wert ist, woraus sich Gleichung 4 für die Bestimmung von CSD-Werten ergibt.^[162]

$$\delta\text{H}_\alpha^{\text{obs}} - \delta\text{H}_\alpha^{\text{rc}} = \Delta\delta\text{H}_\alpha \quad (4)$$

Zur einfachen Berechnung von CSD-Werten wurden von WISHART *et al.* die charakteristischen *random coil* Werte aller Aminosäuren im wässrigen Milieu, sowie von RAINEY *et al.* in DMSO, untersucht und zusammengefasst.^[163,164] Trägt man die berechneten CSD-Werte gegen die Sequenz des Peptides oder Proteins auf ergibt sich ein Diagramm, das einen Aufschluss über die Sekundärstruktur gibt. Positive Werte >0 deuten auf β -Faltblattstrukturen und negative Werte auf helikale Strukturen hin (s. Abbildung 15).

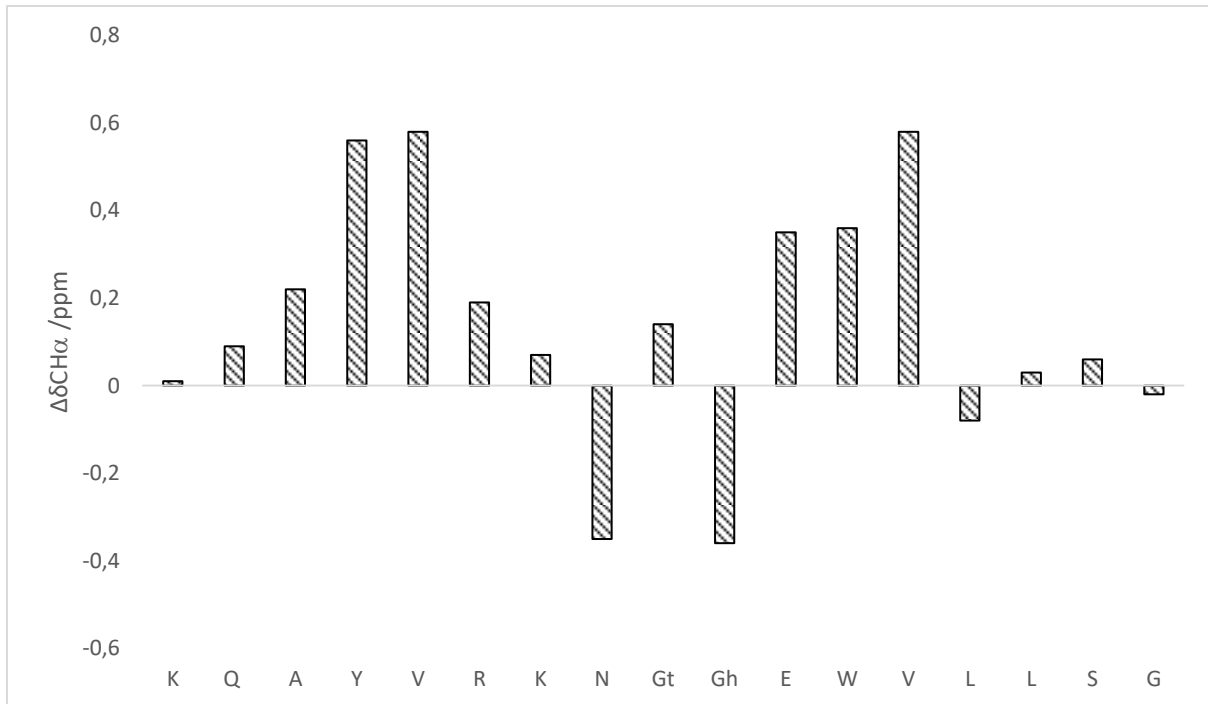


Abbildung 15: Beispiel für die H_α -CSD-Werte anhand eines β -hairpin Peptides. Das C- und N-terminale Ende nimmt keine Vorzugkonformation ein und liegt im Mittel als *random coil* vor, wodurch die Werte nahe bei 0 liegen. Die Aminosäuren, die an der Ausbildung des β -Faltblatts beteiligt sind, nehmen Werte $>0,2$ ein und können gut identifiziert werden. Auch der das NG-Motiv beinhaltenden β -turn, der die β -Stränge miteinander verbindet, kann auf Grund seiner helikalen Struktur und den damit einhergehenden negativen Werten verifiziert werden.

Die Methode der CSD-Werte kann auch zur Verbesserung für die Vorhersage von Sekundärstrukturen von kleinen Peptiden und Proteinfragmenten mit Hilfe der Temperaturkoeffizienten angewandt werden. ANDERSEN *et al.* konnten zeigen, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Temperaturkoeffizienten $\Delta\delta/\Delta T$ und der Abweichung der chemischen Verschiebung der Amidprotonen vom *random coil* Wert (NH-CSD) besteht. Durch das Auftragen der NH-CSD Werte gegen den Temperaturkoeffizienten können langsam austauschende, wasserstoffbrückengebundene Bereiche innerhalb eines Peptides oder Proteins mit einer viel höheren Genauigkeit und Glaubwürdigkeit bestimmt werden als nur mit dem Temperaturgradienten allein.^[150]

2. Aufgabenstellung und Motivation

Bisher diente die thio-MICHAEL-Addition zwischen dem Thiol einer Cystein-Seitenkette eines Peptides/Proteins und einem Maleimid lediglich zum Aufbau von Biokonjugaten. Bemerkenswerterweise wurde bis dato sowohl der Stereoselektivität dieser Reaktion und den dabei auftretenden Diastereomeren (DS) des Succinimid-Thioethers als auch der möglichen Enolisierung dieser kein Interesse beigemessen. Auch das natürlich vorkommende Peptidrückgratregister (-NH-C α -CO-) wurde durch die ausschließliche Verwendung von flexiblen *Linkern* zum Aufbau dieser Konjugate nicht berücksichtigt. Durch die Betrachtung des Succinimid-Thioether-Strukturmotivs als isoster zu einem Aspartimid ergibt sich hieraus jedoch ein neuer Ansatz zur Ligation und Zyklisierung von Peptiden.

Ziel der vorliegenden Arbeit sollte die NMR-spektroskopische Untersuchung der konformationellen Einflüsse von Succinimid-Thioethern innerhalb eines Peptidrückgrates unter Berücksichtigung des natürlich vorkommenden Rückgratregisters sein. Durch die Wahl der Position des Succinimid-Thioethers innerhalb der Sekundärstruktur der Peptide sollte zusätzlich die Gesamtstruktur stabilisiert werden. Zur erfolgreichen Durchführung stand die Erarbeitung neuer Synthesewege zur Darstellung von festphasenkompatiblen chiralen Maleimid-Dipeptidbausteinen und unnatürlichen β -Thioamino-säuren sowie β -Aminothiolen besonders im Fokus. Anschließend sollten diese Bausteine in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt werden. Zur Bildung der Succinimid-Thioether über eine thio-MICHAEL-Addition sollten geeignete Reaktionsbedingungen gefunden werden, um diese an einem ungeschützten Peptid in Lösung anwenden zu können.

Die beiden möglichen Diastereomere der Peptide, die bei der thio-MICHAEL-Addition auftreten, sollten voneinander getrennt werden um den Einfluss der Stereokonfiguration des Succinimid-Ringes auf die Konformation der Peptide zu analysieren. Zu Beginn sollten, aufbauend auf vorangegangene Arbeiten in der Arbeitsgruppe GEYER, NMR-Studien an zyklischen Hexapeptiden durchgeführt werden, die neben dem Succinimid-Thioether zusätzlich das β -turn Mimetikum Hot=Tap beinhalten, welches sich durch seine β -turn induzierenden Eigenschaften auszeichnet. Ferner sollte der Einfluss der Stereokonfiguration der C- und N-Terminal zum Succinimid benachbarten Stereozentren auf die konformative Stabilität untersucht werden.

Damit die thio-MICHAEL-Addition auf ihre Anwendbarkeit in der Peptid-Ligation hin überprüft werden kann, sollte das Strukturmotiv der Succinimid-Thioethern innerhalb des isolierten Foldon- β -hairpins untersucht werden. Hier sollte mit Hilfe eines *Succinimid-Scans* eine geeignete

Ligationsstelle innerhalb des β -turns identifiziert werden und die Konformation der turn-Geometrie mittels NMR-Spektroskopie aufgeklärt werden.

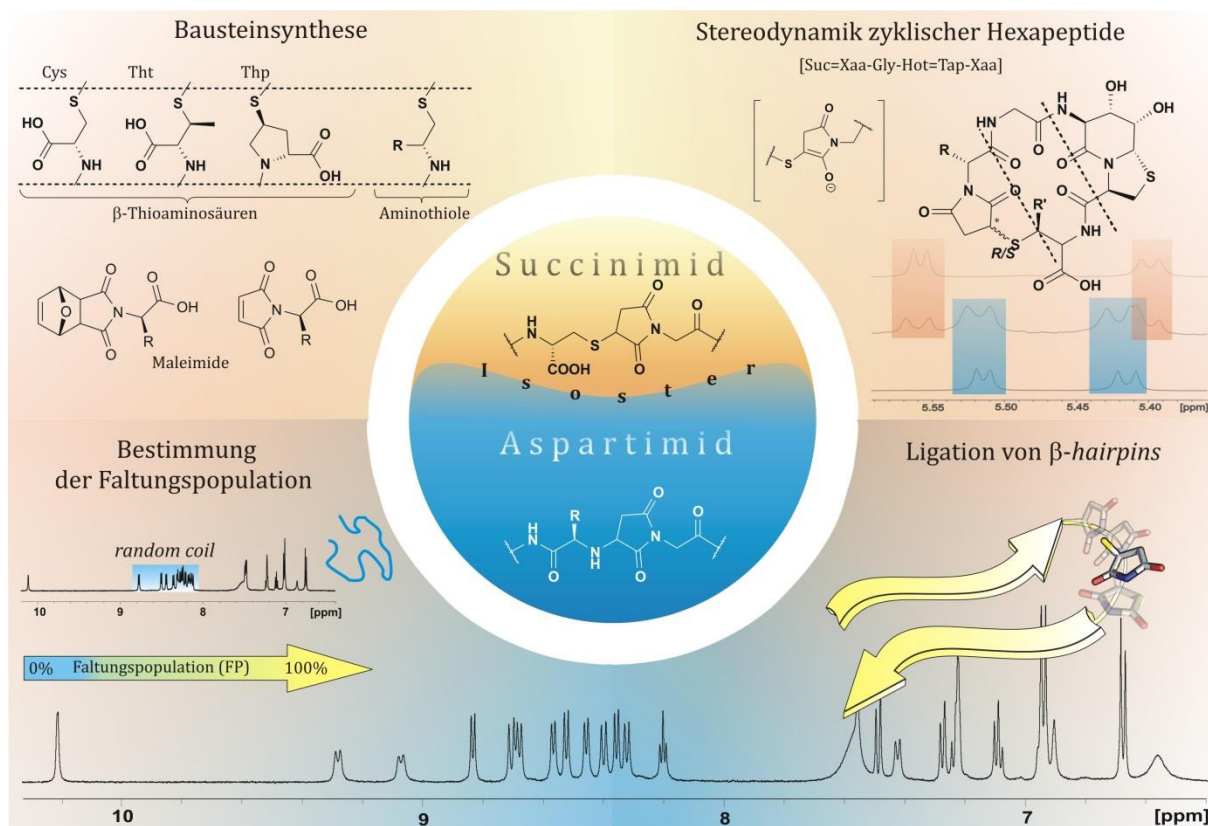
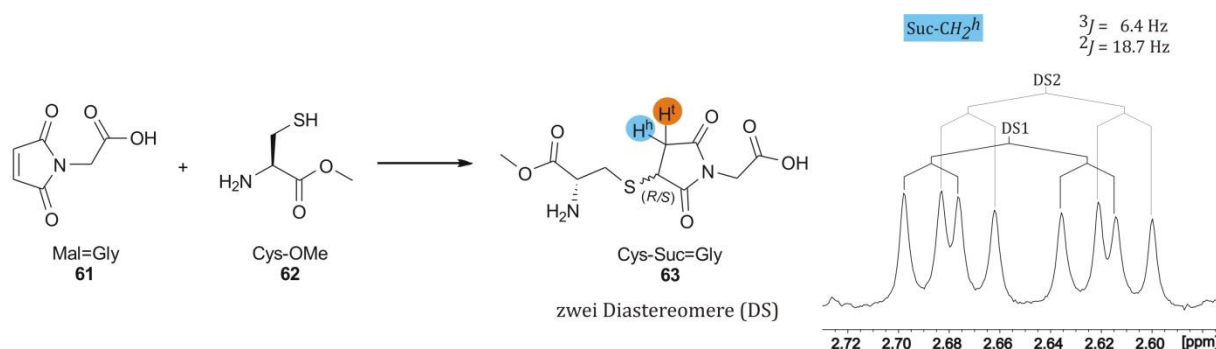


Abbildung 16: Das zum Aspartimid isostere Strukturmotiv eines Succinimid-Thioethers soll innerhalb des natürlich vorkommenden Peptidrückgratregisters untersucht werden. Zum Aufbau der Succinimid-Thioether sollen synthetische Zugänge zu verschiedenen, SPPS-kompatiblen β -Thioaminosäuren, β -Aminothiolen und Maleimid-Dipeptidbausteinen erarbeitet werden. Die Einflüsse der Konformation sowie der Stereokonfigurationen sollen dann in unterschiedlichen Peptidstrukturen untersucht und bewertet werden.

Um eine Vergleichbarkeit über die Stabilität von Sekundärstrukturen und im Speziellen von β -hairpins zu erhalten, sollte hierfür eine einfache, allgemeingültige Methode entwickelt werden, die es ermöglicht, mit Hilfe der NMR-Spektroskopie, eine prozentuale Faltungspopulation der zu synthetisierenden β -hairpins anzugeben. Im Folgenden werden die Ergebnisse der angestrebten Ziele diskutiert.

3. Ergebnisse und Diskussion

Die Reaktion zwischen einem Maleimid und einem Thiol dient, wie bereits eingangs erwähnt (s. Kap. 1.2), zum Aufbau von Biokonjugaten und ist somit ein unerlässliches Werkzeug in der Peptidchemie. Dabei ist jedoch nur sehr wenig über die Stereoselektivität und die Stereodynamik der ausgebildeten Succinimid-Thioether, sowie den Einfluss der entstehenden Diastereomere auf die Konformation eines Peptides oder Proteins, bekannt. Diese Lücke ist bemerkenswert, da bereits das kleinste denkbare Tripeptid mit einer Succinimid-Thioether-Einheit (Cys(OMe)-Suc=Gly **63**) zwei Signalsätze mit unterschiedlicher chemischer Verschiebung für die jeweiligen Diastereomere im ^1H -NMR-Spektrum zeigt (s. Schema 18).^[165,166]



Schema 18: Die Reaktion des Mal=Gly Dipeptidbausteins **61** mit Cysteinmethylester **62** in einer thio-MICHAEL-Addition führt zu zwei Diastereomeren (DS). Das aus dieser Reaktion resultierende Tripeptid Cys(OMe)-Suc=Gly **63** zeigt im ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6) zwei Signalsätze mit unterschiedlichen chemischen Verschiebungen für jedes Diastereomer. Rechts ist der Ausschnitt des Spektrums mit dem hochfeldverschobenen Proton der Diastereotopen Methylengruppe des Succinimid-Rings gezeigt. Die Kopplungskonstanten bleiben bei beiden Diastereomeren unverändert.^[165,166]

Dieses einfache Experiment zeigt, dass das neu gebildete Stereozentrum am Succinimid-Ring schon bei kleinen Peptiden einen Einfluss auf die Konformation des Peptidrückgrates hat. Extrapoliert man dies auf größere Peptide und Proteine wo gezeigt werden konnte, dass die Änderung eines Stereozentrums dazu führen kann, dass eine Sekundär bzw. Tertiärstruktur ausgebildet wird oder nicht, macht dies deutlich, wie wichtig es ist die unterschiedlichen Eigenschaften der möglichen Diastereomere bei der thio-MICHAEL-Addition innerhalb eines Biopolymers und den globalen Einfluss hin zu untersuchen. Schlägt man hier die Brücke zu dem Befund von SATOW *et al.*, dass die spontane Aspartimidbildung der Asp-Gly Dipeptideinheit innerhalb der *turn*-Region des Hühner- Lysozyms zu einer Stabilisierung des β -*turn* führte,^[115] bietet sich hier ein interessanter Ansatz zur Untersuchung von isosteren Succinimid-Thiothern innerhalb solcher Strukturen an.

Im Folgenden werden Succinimid-Thioether als isosterer Erstatz für Aspartimide auf ihre Stabilität, sowie auf ihren konformationellen Einfluss innerhalb von β -turns untersucht und diskutiert.

3.1 Zyklische Hexapeptide mit Succinimid-Thioether innerhalb des Peptidrückgrates als Modell für β -hairpin Peptide

Zyklische Peptide besitzen auf Grund der eingeschränkten Beweglichkeit des Peptidrückgrates eine erhöhte Rigidität und einhergehend damit eine verbesserte Stabilität gegen Proteolyse sowie eine gesteigerte biologische Verfügbarkeit.^[167] Durch die erhöhte Rigidität können Sekundärstrukturen wie α -Helices, β -Faltblätter und β -turns fixiert werden. Diese Eigenschaften qualifizieren sie als nützliches Werkzeug in der biomedizinischen Forschung, besonders für die Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen. Doch auch in der medizinischen Chemie dienen zyklische Peptide zur Untersuchung von Struktur-Wirkungs-Beziehungen, da Epitope innerhalb eines strukturell eingeschränkten Peptides eine bestimmte Konformation einnehmen können.^[149,168,169] Besonders zyklische Hexapeptide zeigten sich als vorteilhaft zur Untersuchung von Konformationen und Konformations-Wirkungs-Beziehungen, sowie der Einfluss von bestimmten Aminosäuresequenzen und einzelnen Aminosäurebausteinen auf diese.^[149,151] Grund hierfür ist, dass zyklische Hexapeptide bevorzugt Sekundärstrukturen mit zwei gegenüberliegenden β -turns ausbilden. Bei Verwendung von D-Aminosäuren, im speziellen D-Prolin an der $i+1$ -Position, wird die Bildung eines $\beta II'$ -turns begünstigt.^[151,170] Diese minimalen antiparallelen β -Faltblätter gehören zu einer der wichtigsten Klassen von Makrozyklen und wurden intensiv untersucht.^[149,171,172]

Um den konformationellen Einfluss von Succinimid-Thioethern als isosteren Ersatz und insbesondere den der beiden möglichen Diastereomere des Succinimids, innerhalb des natürlich vorkommenden Registers des Peptidrückgrates zu untersuchen, sollten im Rahmen dieser Arbeit NMR-Studien an zyklischen Modell-Hexapeptiden (s. Abbildung 17) durchgeführt werden. Zur Fixierung des Hexapeptides in einer antiparallelen β -Faltblattstruktur, wurde hierfür das bizyklische β -turn Mimetikum Hot=Tap verwendet, das in der Arbeitsgruppe GEYER entwickelt wurde. Dieses induziert und stabilisiert in der $i+1$ - und $i+2$ -Position einen $\beta II'$ -turn innerhalb des Hexapeptides, wodurch ein minimales β -Faltblatt ausgebildet wird.^[173] Durch eine gegenüberliegende Anordnung des β -turn Mimetikums Hot=Tap zum Succinimid-Thioether, wird es ermöglicht diesen innerhalb eines stabilen β -turns an der $i+1$ -Position zu untersuchen. Neben den beiden Diastereomeren galt den Stereozentren der benachbarten Aminosäuren in C- und N-terminaler Richtung zum Succinimid ein besonderes Interesse (s. Abb. 17), da diese die

Flexibilität und dementsprechend die Freiheitsgrade des Peptidrückgrates maßgeblich beeinflussen.

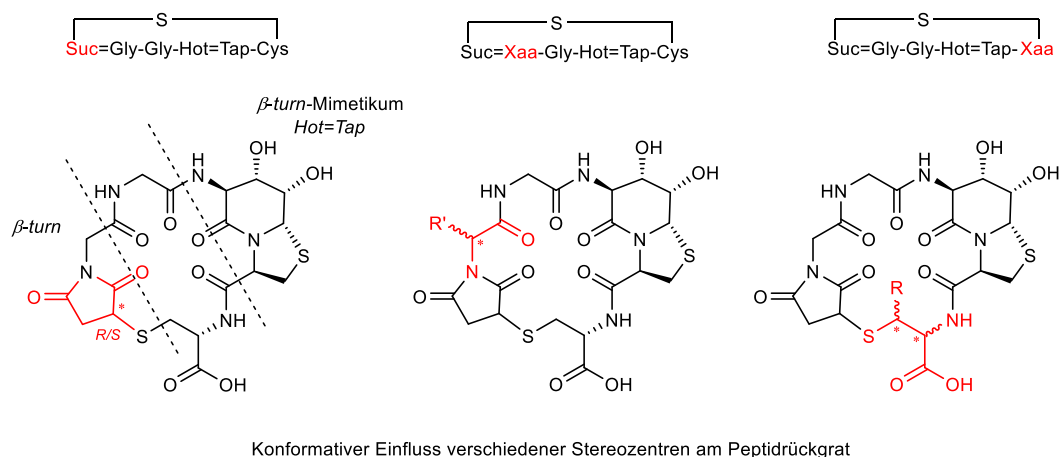


Abbildung 17: Zyklische Modell-Hexapeptide mit einem Succinimid-Thioether innerhalb des Peptidrückgrates. Das β -turn Mimetikum Hot=Tap fixiert den Thioether dabei in einer gegenüberliegenden turn-Struktur in dem das Succinimid die $i+1$ -Position besetzt. Bei der Verwendung von Cysteinderivaten und α -Aminosäuren innerhalb der Mal=Xaa Dipeptidbausteine bleibt das Register des nativen Peptidrückgrates erhalten. Der konformative Einfluss von Stereozentren am Succinimid-Ring (links), dem α -Stereozentrum des Suc=Xaa-Dipeptidbausteins (mitte) sowie den Cysteinderivaten an α - und β -Position (rechts) sollen anhand dieser Hexapeptide mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht werden.

Das flexibelste Rückgrat der in Abbildung 17 dargestellten Modell-Hexapeptide beinhaltet das Succinimid-Glycin-Motiv (Suc=Gly) und eine Cystein-Seitenkette. Um die Freiheitsgrade der Methylengruppen innerhalb des Rückgrates der Hexapeptide weiter einzuschränken, wurden zwei Ansätze verfolgt. Die Synthese von α -chiralen Maleinimid-Dipeptiden sowie das Einführen einer Methylgruppe an der β -Position des Cysteins, woraus die Synthese von Thiothreonin Derivaten folgt. Im Hinblick auf die α -chiralen Maleimide stand besonders die Synthese von D-konfigurierten Dipeptidbausteinen im Fokus. Wie bereits zuvor erwähnt, können D-Aminosäuren innerhalb eines Peptidrückgrates zu einer lokalen Beschränkung der Konformation führen und turn-Strukturen stabilisieren oder auch initiieren.^[151,174] Bei Betrachtung des RAMACHANDRAN-Plots (Auftragung der Diederwinkel ϕ gegen ψ) zeigt sich, dass D-Aminosäuren eine Spiegelung der erlaubten Werte für den Diederwinkel ϕ durch den Ursprung zur Folge haben. Für natürlich L-Aminosäuren liegen die Werte im negativen Bereich, wohingegen D-Aminosäuren positive Werte besitzen. Vergleicht man nun die verschiedenen Kategorien der β -turns die anhand ihrer unterschiedlichen Diederwinkel unterteilt wurden (s. Tabelle 2), zeigt sich, dass $\beta I'$ - sowie $\beta II'$ -turns an der $i+1$ -Position sowie $\beta I'$ - und $\beta II'$ -turns an der $i+2$ -Position positive Werte aufweisen.^[175,176] Gerade diesen turn-Typen wird eine

faltungsinduzierende Wirkung bei der Ausbildung von β -Faltblattstrukturen zugesprochen.^[176] Von BALARAM *et al.* konnte durch die Synthese und anschließende kristallographische Analyse des Oktapeptides Boc-Leu-Phe-Val-Aib-ala-Leu-Phe-Val-OMe gezeigt werden, dass besonders die Dipeptideinheit bestehend aus der achiralen Aminoisobutyrsäure (Aib) und D-Alanin, an der $i+1$ - und $i+2$ -Position, die Induzierung eines $\beta I'$ -turns ermöglicht.^[177]

Tabelle 2: Diederwinkel der verschiedenen β -turn-Typen.^[175,176]

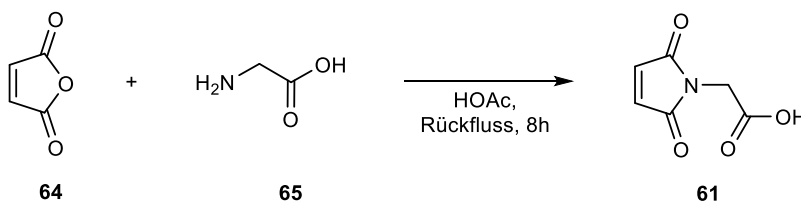
<i>turn</i>	Diederwinkel in Position $i+1$		Diederwinkel in Position $i+2$	
	φ	ψ	φ	ψ
βI	-60°	-30°	-90°	0°
$\beta I'$	60°	30°	90°	0°
βII	-60°	120°	80°	0°
$\beta II'$	60°	-120°	-80°	0°
βVIa	-60°	120°	-90°	0°
βVIb	-120°	120°	-60°	0°

Weitere arbeiten von BALARAM *et al.* sowie IQBAL *et al.* und GELLMAN *et al.* konnten zeigen, dass auch die Dipeptideinheiten D-Pro-Gly, D-Phe-L-Pro, D-Pro-L-Pro und L-Pro-D-Phe zur Stabilisierung von $\beta I'$ - und $\beta II'$ -turns beitragen und die Ausbildung von Sekundärstrukturen begünstigen.^[178-180] Ein besonderes Beispiel für das D-Phe-L-Pro-Motiv ist das natürlich vorkommende zyklische Dekapeptid Gramicidin S mit der Sequenz $\text{zyklo}[\text{Pro-Val-Orn-Leu-D-Phe}]_2$, das zur Klasse der kationischen antimikrobiellen Peptide mit membranzerstörenden Eigenschaften gehört.^[181-183] Die Struktur des Peptids besteht dabei aus einem antiparallelen β -Faltblatt, das aus den gegenüberliegenden Tripeptideinheiten Val-Orn-Leu gebildet wird, die über zwei D-Phe-Pro β -turns mit einander verbunden sind.

Auf Grundlage dieser Ergebnisse stand insbesondere der D-konfigurierten Maleimid-Dipeptidbaustein Mal=phe im Fokus um die Struktur des zyklischen Hexapeptides mit einer D-Aminosäure an der $i+2$ -Position des turns weiter zu stabilisieren. Um auszuschließen das etwaige zu erwartenden Stabilisierungen nicht auf die sterischen Einschränkungen durch den sterisch anspruchsvollen Phenylring zurückzuführen sind, sollte außerdem noch das Maleimid Mal=ala synthetisiert werden, welches den kleinst möglichen D-konfigurierten Maleimid-Dipeptidbaustein darstellt, wodurch ein starker sterischer Effekt der Seitenkette weitgehend ausgeschlossen werden kann.

3.1.1 Synthese der Maleimid-Dipeptidbausteine

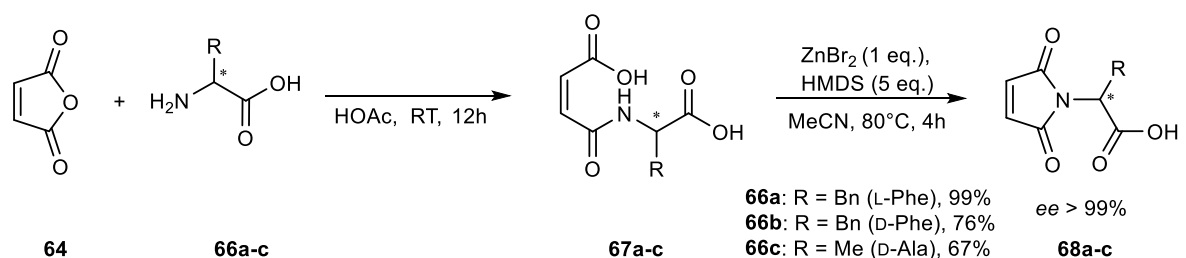
Um die Isosterie des Succinimid-Thioethers zum Aspartimid innerhalb des Peptidrückgrates zu gewährleisten, müssen die Maleimid-Dipeptidbausteine aus α -Aminosäuren durch eine Kondensationsreaktion mit Maleinsäureanhydrid dargestellt werden. Diese werden im folgenden gemäß der von RUDINGER *et al.* erstmals eingeführten und später von GEYER *et al.* definierten Nomenklatur als Mal=Xaa bezeichnet, wobei Xaa jede natürliche α -Aminosäure darstellen kann.^[184,185] Ein bekanntes Problem bei der Synthese von Maleimiden ist die sinkende Ausbeute bei der Kondensation von Maleinsäureanhydrid mit langkettigen Aminosäuren wie γ -Aminobutansäure mit 63% hin zu kurzkettigen α -Aminosäuren wie Glycin mit Ausbeuten von nur noch 23%.^[47,186] Für die Synthese von nicht chiralen Maleimiden wie dem Baustein Mal=Gly (**61**) wurde die von SINCLAIR *et al.* beschriebene Methode der Umsetzung beider Edukte unter Rückfluss in Essigsäure angewandt.^[47] Diese Syntheseroute ermöglichte es, durch die Optimierung des Laufmittels zur säulenchromatographischen Aufreinigung (s. Kap. 6.4.1), den Mal=Gly Baustein (**61**) in einer einstufigen Synthese im Multigramm-Maßstab mit einer reproduzierbaren guten Ausbeute von 51% als farblosen Feststoff darzustellen (s. Schema 19).^[165,166]



Schema 19: Darstellung des Mal=Gly Dipeptidbausteins **61** in einer einstufigen Synthese durch die Kondensation von Maleinsäureanhydrid **64** mit Glycin **65** unter Rückfluss in Essigsäure.^[47] Der Baustein lässt sich auf diesem Syntheseweg mit einer reproduzierbaren Ausbeute von 51% im Multigramm-Maßstab darstellen.^[165,166]

Die Methode von SINCLAIR lies sich jedoch nicht auf chirale Aminosäuren übertragen, da unter diesen Reaktionsbedingungen eine Racemisierung beobachtet wurde, die eine Bildung von bis zu 30% des ungewünschten Enantiomers zur Folge hatte. Da dies auf die harschen Reaktionsbedingungen zurückzuführen war, wurde die Synthese auf zwei Stufen ausgeweitet (s. Schema 20). Im ersten Schritt erfolgte der nukleophile Angriff des Amins der chiralen Aminosäure **66** an das Carbonyl des Maleinsäureanhydrids **64** unter Ringöffnung und Ausbildung der isolierbaren Maloyl-Zwischenstufe **67**. Als Vorteilhaft hat sich auch hier Essigsäure als Lösungsmittel erwiesen, da sie sich durch ihre hohe Polarität gut eignet um die zwitterionischen Aminosäuren zu lösen. Die Reaktion verläuft bei Raumtemperatur quantitativ mit einer maximalen Reaktionsdauer von 12 Stunden. Da beide Reagenzien in einem 1:1 Verhältnis vorliegen und vollständig abreagieren, ist keine weitere Aufreinigung nötig.

Aufgrund der geringen Nukleophilie des Amid-Stickstoffs der Maloyl-Zwischenstufe ist eine Weiterreaktion unter Kondensation zum Imid bei Raumtemperatur nicht möglich. Arbeiten von TORU *et al.* konnten jedoch zeigen, dass unter Zugabe von Hexamethyldisilazan und Zinkbromid als LEWIS-Säure eine Imidbildung unter relativ milden Bedingungen möglich ist.^[187] Basierend auf diesen Ergebnissen wurden geeignete Reaktionsbedingungen für das vorliegende Syntheseproblem zur Darstellung von Mal=phe/Mal=Phe und Mal=ala gesucht. TORU *et al.* definierten Benzol als geeignetes Lösungsmittel, da sie ausschließlich unpolare Amine und im Falle von chiralen Aminosäuren die jeweiligen Methylester verwendeten. Auf Grund des Substitutionsgebotes sowie der hohen Polarität der in dieser Arbeit untersuchten ungeschützten Aminosäuren für die Synthese der Maleimid-Dipeptidbausten wurde Acetonitril als geeignetes Lösungsmittel für die Imidbildung identifiziert. Die relativ hohe Polarität von Acetonitril sowie der nahezu identische Siedepunkt von 82 °C, im Vergleich zu Benzol mit 80 °C, liefern vergleichbare Reaktionsbedingungen zu den von TORU *et al.* beschriebenen.

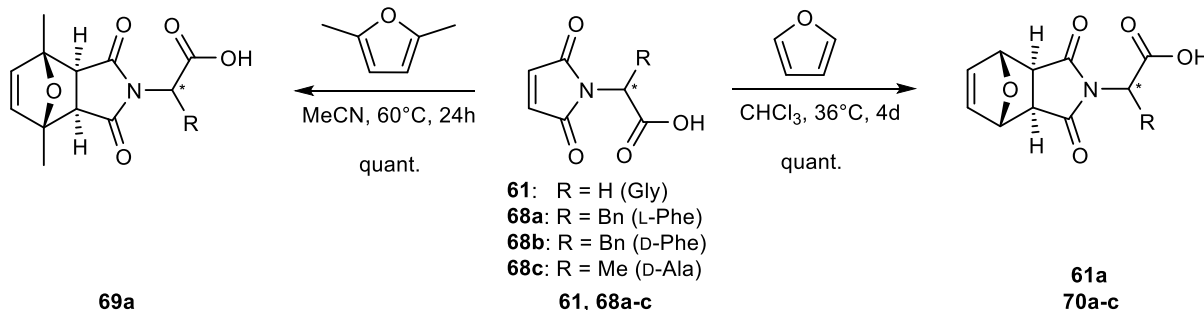


Schema 20: Darstellung von Mal=Xaa Dipeptidbausteinen **68a-c** mit chiralen α -Aminosäuren **66a-c** nach der von TORU *et al.* entwickelten Synthesemethode zum Ringschluss der Maloylzwischenstufe **67a-c** mit HMDS und ZnBr_2 als LEWIS-Säure.^[187]

Der zugrundeliegende Mechanismus für die HMDS vermittelte Imidbildung wurde bis heute nicht eindeutig geklärt. Dennoch steht fest, dass durch die Zugabe einer LEWIS-Säure, wie in diesem Fall Zinkbromid, die Elektrophilie des Maloyl-Carboxylates erhöht. Weiterhin schlagen TORU *et al.* vor, dass das so aktivierte Carboxylat intermediär durch die Übertragung einer Trimethylsilylgruppe des HMDS ein Trimethylsilylester bildet.^[188] Die Triebkraft für die Übertragung der Silylgruppe des HMDS auf das Carboxylat ist in der um 26 kcal/mol stärkeren Sauerstoff-Silicium-Bindung begründet.^[189] Unter thermischer Deoxysilylierung und gleichzeitigem nukleophilen Angriffs des Amid-Stickstoffs wird dann das Imid gebildet. Arbeiten von GRUBB *et al.* sowie VORBRÜGGEN *et al.* zeigten, dass die Triebkraft für diesen Schritt die Ausbildung des thermodynamisch stabileren Disiloxan oder Trimethylsilanol ist.^[190,191] Diese Beobachtungen erklären auch, warum bei Raumtemperatur, selbst bei Zugabe von Zinkbromid und HMDS, keine Reaktion beobachtet werden kann. Weiterhin werden auf Grund des freien C-Terminus der hier verwendeten α -Aminosäuren **66a-c** mindestens zwei Äquivalente HMDS

benötigt, da auch der C-Term der Maloyl-Zwischenstufe einen Silylester bilden kann, der bei der wässrigen Aufarbeitung wieder hydrolysiert wird. Die in Schema 20 gezeigten Reaktionsbedingungen stellen die optimierten Bedingungen dar, die für alle α -Aminosäuren ohne funktionelle Gruppen in der Seitenkette angewandt werden können. Für die Synthese von seitenkettenfunktionalisierten Maleimiden sei an dieser Stelle auf Kapitel 3.3.1.4.1 verwiesen. Diese äußerst milde Methode zur Darstellung von Imiden ermöglichte es die α -chiralen Maleimid-Dipeptidbausteine Mal=Phe **68a**, Mal=phe **68b** und Mal=ala **68c**, in reproduzierbar guten bis sehr guten Ausbeuten zwischen 67% und 99% zu erhalten. Eine Racemisierung wurde in keinem der Fälle beobachtet.

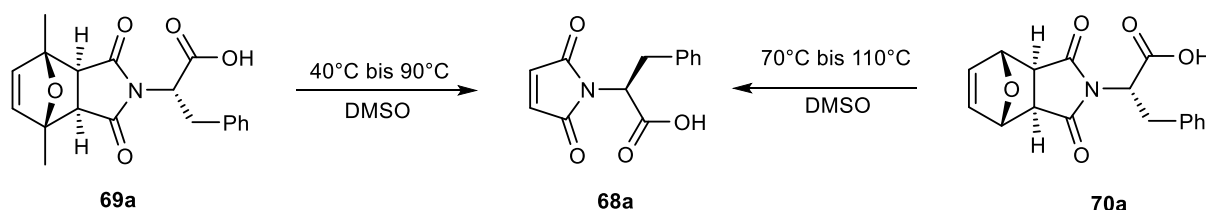
Um die stark elektronendefiziente Doppelbindung der Maleimid-Dipeptidbausteine während der Festphasenpeptidsynthese vor Nebenreaktionen wie einer MICHAEL-Addition durch den freien N-Terminus des am Harz gebundenen Peptides oder anderen Nukleophilen zu schützen, wurde diese nach der von GRANDAS *et al.* entwickelten Methode mit Furan in einer DIELS-ALDER-Reaktion (DA) geschützt (s. Schema 21).^[84,192] Da die retro-DIELS-ALDER-Reaktion zur Entschützung der furangeschützten Maleimide erst bei 110 °C vollständig abläuft, wurde zusätzlich noch die DIELS-ALDER-Reaktion mit Dimethylfuran als mögliche Schutzgruppe untersucht, die eine vollständige Entschützung bei 90 °C ermöglichen soll.^[84]



Schema 21: DIELS-ALDER-Reaktion der Maleimid-Dipeptidbausteine **68** und **61** mit Furan (rechts) oder Dimethylfuran (links) zur Schützung der Maleimid-Doppelbindung um Nebenreaktionen während der SPPS zu vermeiden.^[84,193]

Die von GRANDAS *et al.* publizierten Reaktionsbedingungen konnten ohne Änderung auf die Maleimide **68a-c** übertragen werden. Nur eine Anpassung der Reaktionszeiten wurde vorgenommen, um das thermodynamische *exo*-Produkt der DIELS-ALDER Reaktion **70a-c** zu erhalten. Alle Reaktionen verliefen dabei quantitativ. Jedoch wurde nach der Aufarbeitung des Dimethylfuran-Adduktes **69a** eine Teilweise Entschützung der Maleimid-Doppelbindung von 15% festgestellt. Es stellte sich heraus, dass die retro-DIELS-ALDER-Reaktion des Dimethylfuran-Adduktes **69a** bereits bei 40 °C im Wasserbad des Rotationsverdampfers einsetzt (s. Schema 22). Dadurch stellt dies keine Alternative für die furangeschützten Maleimide dar, da bei der automatisierten Festphasenpeptidsynthese Temperaturen zwischen 50 °C und 90 °C,

abhängig vom verwendeten Trägerharz während der Kupplung sowie der Fmoc-Entschützung, auftreten.

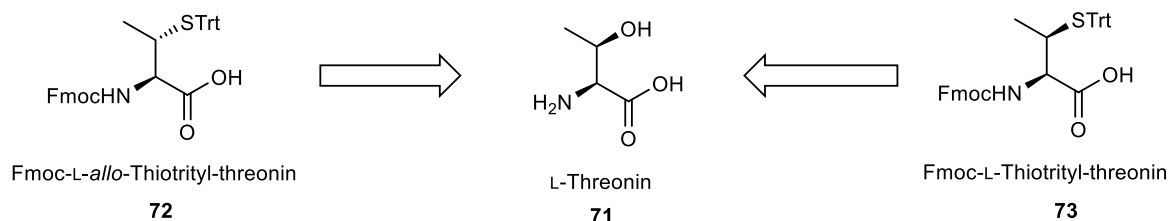


Schema 22: Untersuchungen zur retro-DIELS-ALDER-Reaktion der DIELS-ALDER-Addukte **69a** und **70a**. Bei dem Dimethylfuran-Addukt **69a** tritt schon bei sehr niedrigen Temperaturen ab 40 °C eine Rückreaktion von bis zu 15% auf, wodurch es nicht geeignet ist in der Festphasenpeptidsynthese eingesetzt zu werden, da bei der automatisierten SPPS Temperaturen zwischen 50 °C und 90 °C, abhängig vom Trägerharz, erreicht werden können.

Aus diesem Grund wurden ausschließlich die Furan-Addukte **70a-c** in der Festphasenpeptidsynthese zur Darstellung der linearen Präkursor-Peptide für die zyklischen Modell-Hexapeptide verwendet, da hier eine retro-DIELS-ALDER-Reaktion erst oberhalb von 70 °C eintritt.^[165] Obwohl die Temperaturen für eine vollständige retro-DIELS-ALDER-Reaktion für die Furan-Addukte mit 110-120 °C sehr hoch ist, wurde keine Racemisierung der Maleimid-Dipeptidbausteine beobachtet.

3.1.2 Synthese von Fmoc-L-*allo*-Thiotrityl-Threonin und Fmoc-L-Thiotrityl-Threonin

Um den konformationellen Einfluss von Stereozentren in Nachbarschaft zu einem Succinimid-Thioether innerhalb des Peptidrückgrates zu Untersuchen, wurde neben der zuvor Diskutierten Synthese der α -chiralen Maleimid-Dipeptide, als zweiter Ansatz das Einführen einer Methylgruppe an der β -Position der Cystein-Seitenkette untersucht. Der damit verbundene Aufbau eines Stereozentrums an der Cystein-Seitenkette, die sich nach der Ausbildung des Succinimid-Thioethers innerhalb des Peptidrückgrates befindet, führt zu einer konformationellen Einschränkung und ermöglicht dadurch eine weitere Rigidifizierung.



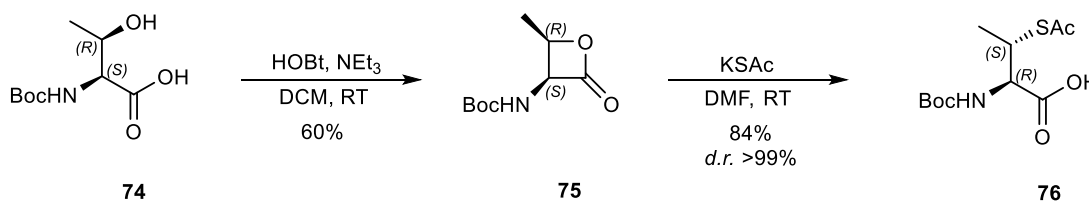
Schema 23: Darstellung der SPPS-kompatiblen Fmoc-Thiothreoninderivate **72** und **73** ausgehend von L-Threonin **71**.

Die daraus resultierenden Thiothreonin-Derivate **72** und **73** sollten ausgehend von L-Threonin **71** als festphasenkompatible Fmoc-Aminosäuren synthetisiert werden (s. Schema 23). Synthetische Zugänge zu den beiden Diastereomeren mit einer D-Konfiguration am α -Stereozenrum wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

3.1.2.1 Fmoc-L-*allo*-Thiotrityl-Threonin

Die Synthese hin zum freien L-*allo*-Thiothreonin wurde erstmals von CHEN *et al.* beschrieben.^[194] Die Schlüsselschritte dieser Syntheseroute sind die Bildung und anschließende stereoselektive Öffnung eines L-Threoninyl- β -lactons. Durch Anpassung der Schutzgruppenstrategie sollte, basierend auf diesen Ergebnissen, eine Synthesestrategie zur Darstellung des SPPS-kompatiblen Fmoc- und Trt-geschützten Thiothreonin derivatives **72** erarbeitet werden.

Im ersten Schritt wurde hierfür das primäre Amin des L-Threonins **71** unter basischen Bedingungen mit Di-*tert*-butyldicarbonat in Anwesenheit von Diisopropylethylamin umgesetzt, wodurch die Aminosäure N-Boc-L-Threonin **74** in 81% Ausbeuten erhalten wurde. Die anschließende β -Lacton-Bildung wurde durch Zugabe des Kupplungsreagenzes HOBt zur Aktivierung der Carboxylgruppe realisiert. Hierzu wurde die Boc-geschützte Aminosäure **74** in Dichlormethan gelöst und nach der Zugabe von Triethylamin und HOBt für 17 h bei Raumtemperatur rühren gelassen. Nach der säulenchromatographischen Aufreinigung konnte das β -Lacton **75** in 60% Ausbeute erhalten werden (s. Schema 24).



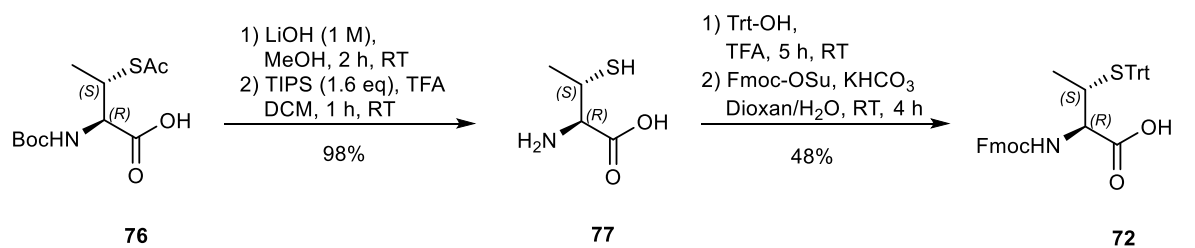
Schema 24: Schlüsselschritte der Synthese von Fmoc-L-*allo*-Thiotrityl-Threonin **72**. Bildung des β -Lactons **75** mit Hilfe des Kupplungsreagenzes HOBt und anschließende regio- und stereoselektive Ringöffnung mit Kaliumthioacetat zum N-Boc-S-acetyl-L-*allo*-Thiothreonin **76**.

Der wichtigste Schritt in der Syntheseroute ist die regio- und stereoselektive Ringöffnung des β -Lactons **75**. Auf Grund des ambidenten Charakters des β -Lactons können Nukleophile gemäß dem HSAB-Prinzip sowohl am β -Kohlenstoffatom als auch dem Carbonyl-Kohlenstoffatom angreifen. Zur näheren Untersuchung der Selektivität von verschiedenen Nukleophilen wurden hierzu von PANSARE *et al.* Studien an unterschiedlichen β -Lactonen durchgeführt.^[195] CHEN *et al.* identifizierten für den speziellen Fall des Threoninyl- β -Lactons Kaliumthioacetat als

geeignetes Reagenz zur selektiven Ringöffnung. Da das Thioacetat ein weiches Nukleophil darstellt, erfolgt der Angriff rückseitig am β -Kohlenstoff des Lactons nach einem S_N2 -Mechanismus unter Inversion der relativen Konfiguration des Stereozentrums (s. Schema 24). Zur Durchführung wurde das β -Lacton **75** unter Schutzgas in DMF gelöst und nach der Zugabe von Kaliumthioacetat für 24 h bei Raumtemperatur rühren gelassen. Nach der Aufreinigung konnte *N*-Boc-S-acetyl-L-*allo*-Thiothreonin **76** in 84% Ausbeute als gelber Feststoff isoliert werden. Das Vorhandensein von nur einem Signalsatz im ^1H -NMR Spektrum zeigt, dass die Ringöffnung stereoselektiv und regioselektiv abgelaufen ist, da bei einem nukleophilen Angriff des Thioacetates von der Vorderseite an das β -Lacton **75** ein diastereomeres Produkt zur Verbindung **76** zur Folge hätte und im ^1H -NMR Spektrum einen zweiten Signalsatz verursachen würde. Um weiterhin auszuschließen, dass sich während der vorangegangenen Reaktionen durch Epimerisierung des α -Stereozentrums Enantiomere gebildet haben, die im ^1H -NMR Spektrum nicht voneinander unterschieden werden können, wurde die Aminosäure **76** in einer Kupplungsreaktion mit Phenylalaninmethylester in Gegenwart von HOBt zum Dipeptid umgesetzt. Hierdurch werden wieder Diastereomere gebildet, die dann im ^1H -NMR Spektrum und auch im HPLC-Chromatogramm voneinander unterscheidbar sind. Auch hier konnte kein zweiter Signalsatz identifiziert werden, woraufhin die Verbindung mit einem Diastereomerenüberschuss (*d.r.*) von >99% charakterisiert werden kann.

Um das Thiothreonin-Derivat **76** in der SPPS mit Fmoc-Strategie einsetzen zu können müssen die Schutzgruppen am *N*-Terminus und der Seitenkette ausgetauscht werden. Für die Seitenkette sollte die Trityl-Schutzgruppe eingeführt werden, die auch bei kommerziell erhältlichen Fmoc-Cystein als Schutzgruppe für das Thiol dient und zusammen mit allen anderen Schutzgruppen am Ende der Synthese im Säuren mit TFA abgespalten werden kann.^[196,197]

Um dies zu bewerkstelligen wurde *N*-Boc-S-acetyl-L-*allo*-Thiothreonin **76** in Methanol gelöst und mit einer 1 M Lithiumhydroxid-Lösung versetzt, um das Thioacetat in der Seitenkette zu verseifen. Das freie Thiol konnte nach wässriger Aufarbeitung quantitativ als gelbes Öl erhalten werden.



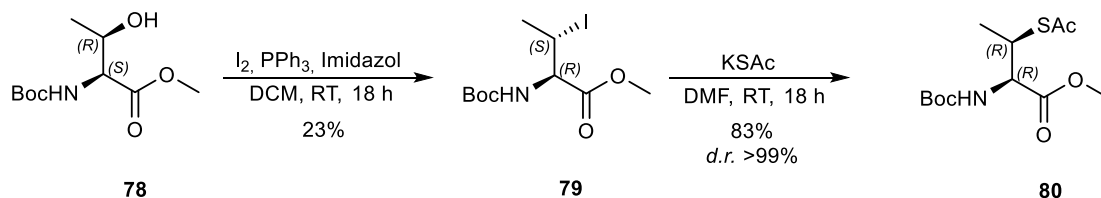
Schema 25: Einführen der SPPS-Kompatiblen Schutzgruppen zur Darstellung von Fmoc-L-*allo*-Thiotrityl-Threonin **72**.

Da die Einführung der Trityl-Schutzgruppe mit Triphenylmethanol (Trt-OH) im Säuren unter S_N1 -Bedingungen abläuft, wurde zuvor die *N*-terminale Boc-Schutzgruppe ebenfalls unter sauren Bedingungen in TFA abgespalten. Damit das freie Thiol in der Seitenkette als starkes Nukleophil keine Nebenreaktion mit dem entstehenden *tert*-Butylkation bzw. Isobuten während der Entschützung der Boc-Schutzgruppe eingeht, wurden 1.6 eq TIPS als *scavenger* zur Reaktionsmischung hinzugegeben (s. Schema 25). Hierdurch wird eine mögliche *tert*-Butylierung des Thiols unterdrückt und die Ausbeuten gesteigert. Die freie Aminosäure **77** wurde ausgehend von *N*-Boc-S-acetyl-L-*allo*-Thiothreonin **76** in 98% Ausbeute als blassgelber Feststoff erhalten. Dieser wurde in TFA gelöst und mit Triphenylmethanol umgesetzt. Nach 5 Stunden bei Raumtemperatur wurde mittels $^1\text{H-NMR}$ ein quantitativer Umsatz festgestellt. Nach entfernen des Lösungsmittels wurde die zwitterionische, Trityl-geschützte Aminosäure ohne weitere Aufarbeitung in der Fmoc-Schützung des freien *N*-Terminus eingesetzt. Diese wurde im Basischen mit Fmoc-OSu als Reagenz, in einem 3:2 Gemisch aus Dioxan und Wasser als Lösungsmittel, realisiert (s. Schema 25). Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte der SPPS-kompatible Baustein Fmoc-L-*allo*-Thiotrityl-Threonin **72** in 48% Ausbeute als farbloser Feststoff erhalten werden. Dieser kann ohne Einschränkungen in der SPPS eingesetzt werden und bleibt auch in Lösung für zwei Wochen stabil. Die Gesamtausbeute über sieben Stufen beträgt 19% und es sind nur zwei säulenchromatographische Aufreinigungen notwendig. Hierdurch eignet sich diese Syntheseroute sehr gut zur Darstellung des gewünschten Thiothreonin-Derivates **72**. Auch eine Durchführung im Multigramm Maßstab ist bei den hier verwendeten Reagenzien kein Problem. Weiterhin ist dieser hier entwickelte Zugang zu Thiothreonin durch die Verwendung der Boc-Schutzgruppe deutlich kostengünstiger als die von CHEN *et al.* ausgearbeitete Syntheseroute mit der NVOC-Schutzgruppe.

3.1.2.2 Fmoc-L-Thiotrityl-Threonin

Für die Darstellung des Fmoc-L-Thiotrityl-Threonins **73** sind in der Literatur keine Synthesen ausgehend von L-Threonin bekannt. Es sind lediglich Syntheserouten ausgehend von L-*allo*-Threonin über eine Aziridin-Zwischenstufe beschrieben.^[194] Da L-*allo*-Threonin jedoch mit ~400€/g ein sehr teures Startmaterial für die Synthese ist, sollte eine Syntheseroute ausgehend von L-Threonin (10€/g) entwickelt werden. Wird das Edukt L-Threonin **71** und das Produkt **73** der geplanten Synthese betrachtet, fällt auf, dass die relative Stereokonfiguration erhalten bleibt (s. Schema 23). Daher wurde eine Syntheseroute entwickelt, die als Schlüsselschritt eine doppelte Stereoinversion des Stereozentrums am β -Kohlenstoffatom der Aminosäure, zur

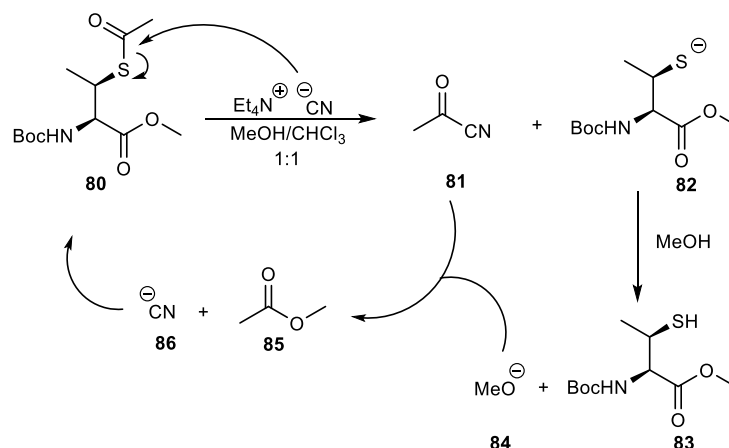
Einführung des Schwefelatoms, beinhaltet (s. Schema 26). Um Nebenreaktionen der anderen funktionellen Gruppen während der Synthese zu vermeiden, wurde L-Threonin **71** N-terminal mit einer Boc-Schutzgruppe, analog zu Kap. 3.1.2.1, geschützt und der C-Term in einer Veresterung mit Acetylchlorid in Methanol quantitativ in den Methylester **78** überführt.



Schema 26: Schlüsselschritte der Synthese von Fmoc-L-Thiotrityl-Threonin **73**. Die notwendige doppelte Stereoinversion am β -Kohlenstoffatom zur Einführung des Schwefels wurde durch eine APPEL-Reaktion mit elementarem Iod und anschließender S_N2 -Reaktion des Iodids **79** mit Kaliumthioacetat als Nukleophil hin zum N-Boc-S-acetyl-L-Thiothreonin **80** erreicht.

Ausgehend von der N- und C-terminal geschützten Aminosäure **78** wurde die erste Inversion des Stereozentrums am β -Kohlenstoffatom durch eine APPEL-Reaktion mit elementarem Iod realisiert. Das geschützte Threonin-Derivat **78** wurde unter Schutzgas in Dichlormethan gelöst und zu einer Lösung aus elementarem Iod, Triphenylphosphin und Imidazol in Dichlormethan getropft. Nach 18 Stunden unter Rühren bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch aufgereinigt. Das Produkt **79** konnte dabei als farbloses Öl mit einer Ausbeute von 23% erhalten werden. Die schlechten Ausbeuten auf dieser Stufe können durch die E2-Eliminierung als Nebenreaktion erklärt werden, die durch die antiperiplanare Anordnung der Substituenten begünstigt wird. Das entstehende Nebenprodukt Dehydrothreonin wird weiterhin durch die Ausbildung eines Enonsystems stabilisiert, wodurch auch hier das Gleichgewicht auf die Seite des Nebenproduktes verschoben wird. Auf Grund der hohen Instabilität konnte Verbindung **79** nicht gelagert werden und wurde direkt weiter in einer S_N2 -Reaktion in DMF mit Kaliumthioacetat als Nukleophil unter erneuter Stereoinversion am β -Kohlenstoffatom umgesetzt. Nach säulenchromatischer Aufreinigung konnte N-Boc-S-acetyl-L-Thiothreonin **80** in 83% Ausbeute als braunes Öl isoliert werden. Das 1H -NMR-Spektrum zeigte auch hier keinen zweiten Signalsatz, wodurch die Verbindung mit einem Diastereomerenüberschuss (*d.r.*) von >99% charakterisiert werden kann (s. Kap. 6.3.2.2). Ausgehend von der vollständig geschützten Aminosäure **80** sollte im nächsten Reaktionsschritt zeitgleich das Thioacetat in der Seitenkette und der C-terminale Methylester verseift werden. Jedoch konnte bei der Umsetzung von **80** mit anorganischen Basen wie LiOH (1 M) und NaOH (1 M) in Methanol oder THF nicht das gewünschte, doppelt verseifte Produkt isoliert werden. Neben dem Eliminierungsprodukt Dehydrothreonin und weiteren nicht

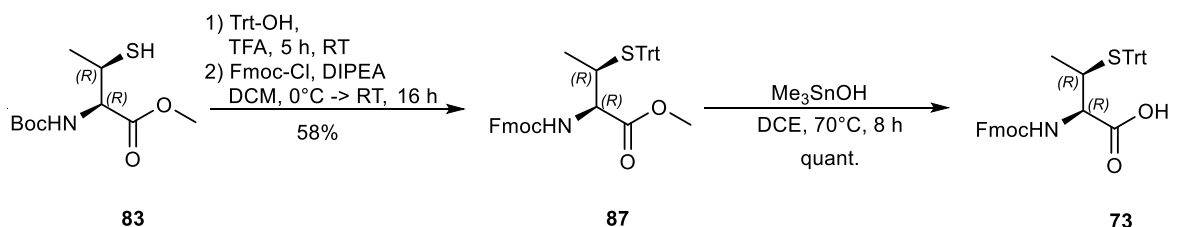
identifizierbaren Nebenprodukten konnte weiterhin eine Epimerisierung im ^1H -NMR-Spektrum beobachtet werden. Um diese Nebenreaktionen zu vermeiden wurde die Verseifung des Thioacetates selektiv unter neutralen Bedingungen mit Tetraethylammoniumcyanid durchgeführt (s. Schema 27). Die Methode zur selektiven Spaltung wurde von aliphatischen Thioacetaten wurde von HOLMES *et al.* unter der Verwendung von Tetrabutylammoniumcyanid entwickelt.^[198] Da Tetrabutylammoniumcyanid jedoch stark hygroskopisch ist und nur unter Luftausschluss gehandhabt werden kann, wurde für diese Synthese Tetraethylammoniumcyanid eingesetzt. Dieses ist luftstabil, nicht hygroskopisch und erzielt unter den von HOLMES beschriebenen Reaktionsbedingungen identische Resultate. Der zugrunde liegende Mechanismus ist in Schema 27 dargestellt. Das Cyanidion **86** greift nukleophil am Carbonyl-Kohlenstoffatom des Thioesters **80** unter Bildung des Acetylcyanids **81** und dem Thiolat **82** an. Das Thiolat **82** deprotoniert das Methanol aus dem Lösungsmittelgemisch zum Methanolat **84** unter Freisetzung des Thiols **83**. Durch eine Umesterung wird dann Essigsäuremethylester generiert und das Cyanidion **86** wieder freigesetzt, welches für einen weiteren Katalysezyklus zur Verfügung steht. HOLMES *et al.* konnten zeigen, dass diese Reaktion stark vom verwendeten Lösungsmittelgemisch abhängig ist, sowie von den äußeren Bedingungen. So eignet sich Methanol in Kombination mit Dichlormethan oder Chloroform sehr gut und liefern Ausbeuten >80%. Bei der Verwendung von THF als Kosolvens (THF/MeOH) wurde die Bildung von Disulfiden als Nebenreaktion beobachtet. Selbes wurde auch beschrieben, wenn die Reaktion nicht unter Schutzgas durchgeführt wurde.^[198]



Schema 27: Der von HOLMES *et al.* postulierte Reaktionsmechanismus zur selektiven Spaltung des aliphatischen Thioesters **80** mit Tetraethylammoniumcyanid in Gegenwart von Methanol.^[198]

Durch die Reaktion von Tetraethylammoniumcyanid mit der vollständig geschützten Aminosäure **80** in einem 1:1 Gemisch aus Chloroform und Methanol konnte das freie Thiol **83** in quantitativen Ausbeuten als braunes Öl erhalten werden. Durch einfach wässrige Aufarbeitung ist hier keine säulenchromatographisch Aufreinigung notwendig. Bemerkenswerter Weise ist

das Thiol über längere Zeit in Lösungsmittel stabil und zeigt keine Tendenz zur Disulfidbildung. Auch bei der folgenden Abspaltung der Boc-Schutzgruppe wurde keine *tert*-Butylierung des Schwefels beobachtet, wenn kein *scavenger* zum Abfangen des *tert*-Butylkations der Reaktionsmischung zugeführt wurde. Die Nukleophilie des Schwefels von L-Thiothreonin ist im Vergleich zum L-*allo*-Thiothreonin deutlich herabgesetzt. Das freie Thiol wurde dann analog zu der in Kapitel 3.1.2.1 beschriebenen Methode mit Triphenylmethanol in TFA als Lösungsmittel umgesetzt (s. Schema 28). Auf Grund der zuvor beobachteten Labilität des Aminosäurebausteins gegenüber anorganischen Basen wurde der freie *N*-Terminus mit Fmoc-Cl in Gegenwart von DIPEA als Base und nicht, wie zuvor zur Synthese des L-*allo*-Thiothreonins beschrieben, mit Fmoc-OSu und Natriumhydrogencarbonat umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte der vollständig geschützte Aminosäurebaustein **87** in 58% Ausbeute als farbloser Feststoff isoliert werden. Eine besondere Herausforderung bestand nun darin den Methylester selektiv in Gegenwart einer säurelabilen (Trt) und einer basenlabilen (Fmoc) Schutzgruppe zu verseifen. Als geeignetes Reagenz zeigte sich das von NICOLAOU *et al.* erstmals zur Methylester-Verseifung beschriebene Trimethylzinnhydroxid.^[199] Auf Grund der neutralen Reaktionsbedingungen und der hohen Selektivität des Reagenzes für Methylester, konnte das finale Produkt Fmoc-L-Thiotrityl-Threonin **73** auf dieser Stufe in quantitativen Ausbeuten als farbloser Feststoff erhalten werden (s. Schema 28).

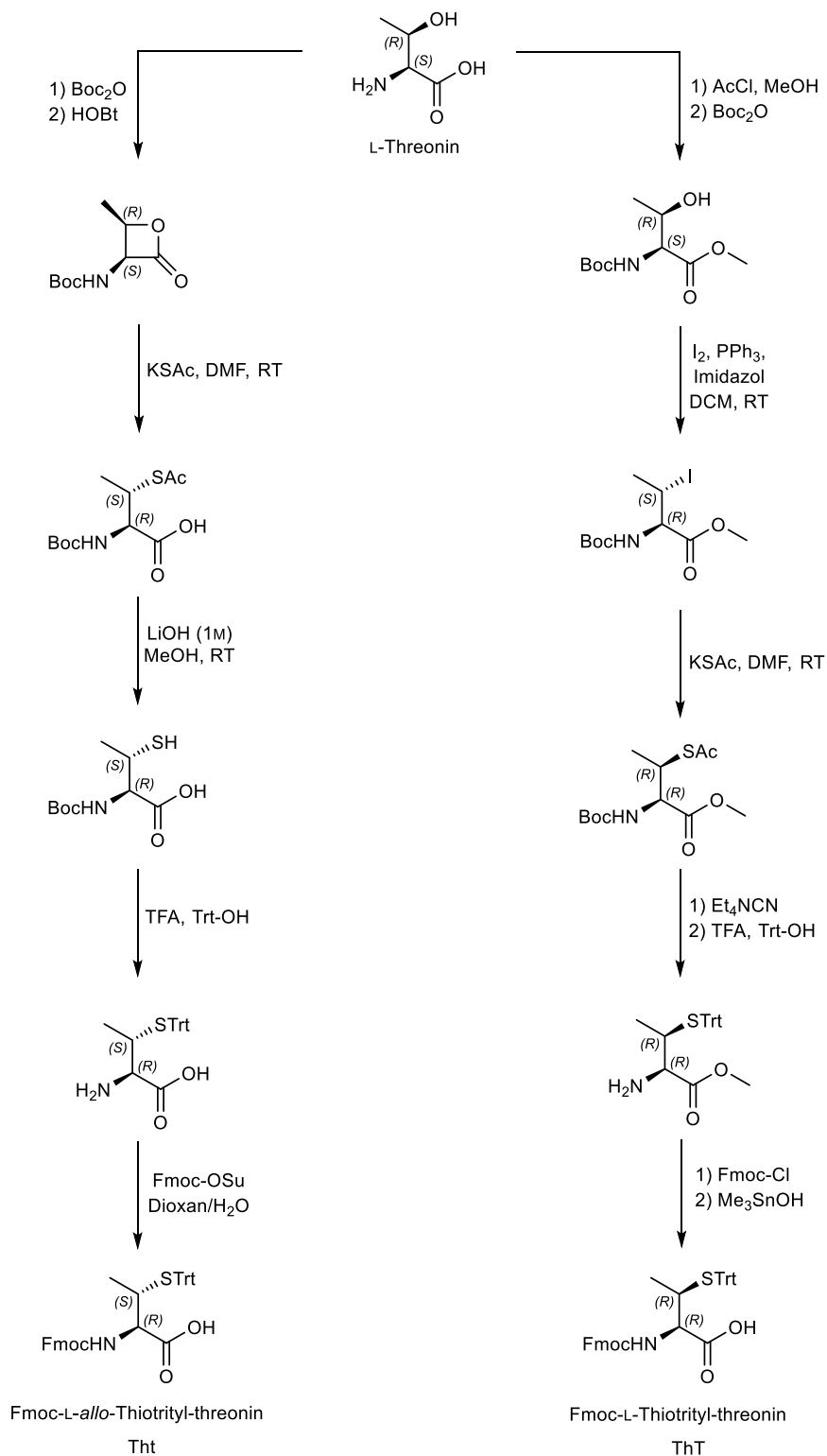


Schema 28: Einführen der SPPS-Kompatiblen Schutzgruppen und finale Verseifung des Methylesters **87** mit Trimethylzinnhydroxid zur Darstellung von Fmoc-L-Thiotrityl-Threonin **73**.

Dennoch hat die Verwendung von Trimethylzinnhydroxid zwei Nachteile: es ist ein stark toxisches Reagenz, was einen sorgsamen Umgang erfordert, und die Abtrennung des nach der wässrigen Aufarbeitung entstehenden Stannans ist selbst nach säulenchromatographischer Aufreinigung nicht vollständig. Da das Stannan aber keine Folgereaktionen in der SPPS beeinträchtigt konnte die Aminosäure in der Peptidsynthese eingesetzt werden.

Somit ist dies die erste erfolgreiche Synthesroute für Fmoc-L-Thiotrityl-Threonin **73** ausgehend von L-Threonin. Die Gesamtausbeute beträgt 10% über acht Stufen mit vier säulenchromatographischen Aufreinigungen. Unter den Synthesebedingungen zur Darstellung der zyklischen Hexapeptide durch eine retro-DA und anschließender MICHAEL-Addition bei 120 °C zeigte sich jedoch, dass die Aminosäure nicht stabil ist und das gewünschte Peptid nicht

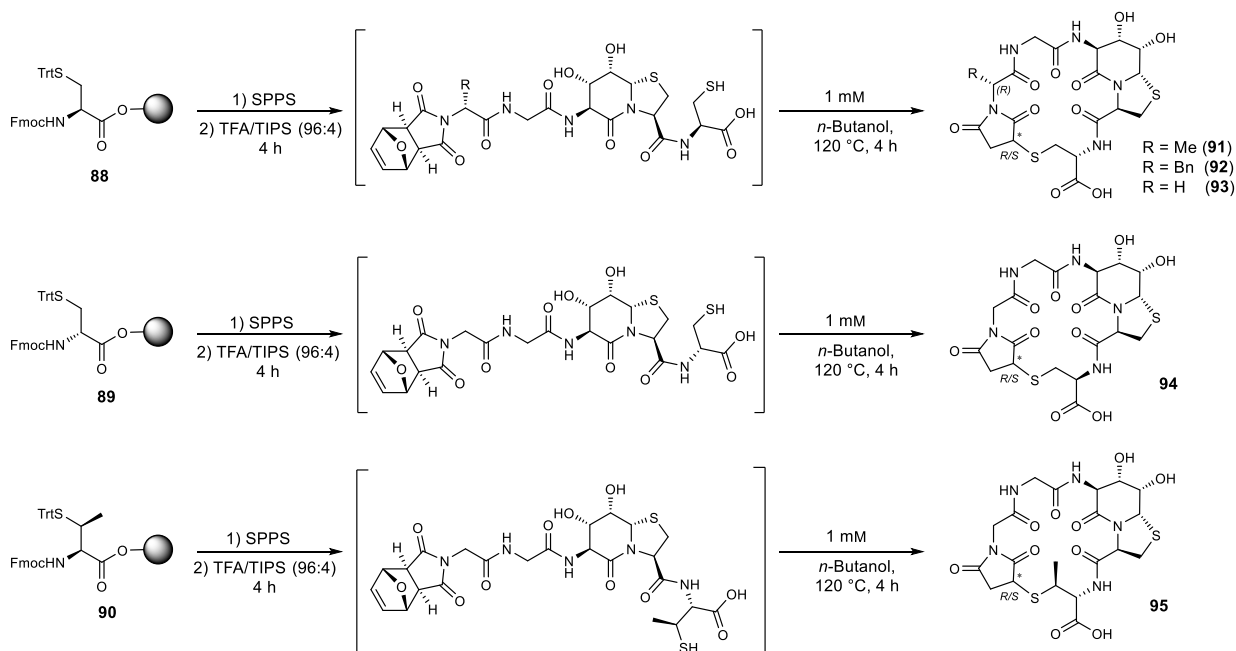
isoliert werden konnte. Die Anwendung von **73** ist daher auf die klassische SPPS begrenzt (s. Kap. 3.3.1.3.1). In Schema 29 sind alle Stufen für den synthetischen Zugang zu den Thiotreonin-Derivaten **72** und **73** ausgehend von L-Threonin **71** zusammengefasst.



Schema 29: Zusammenfassendes Reaktionsschema aller Stufen der beiden Synthesen von Fmoc-L-allo-Thiotrityl-Threonin (Kap. 3.1.2.1) und Fmoc-L-Thiotrityl-Threonin (Kap. 3.1.2.2), ausgehend von L-Threonin.

3.1.3 Synthese der zyklischen Hexapeptide

Für die Synthese der zyklischen Hexapeptide wurden zunächst mit Hilfe der von MERRIFIELD entwickelten Festphasenpeptidsynthese, mit der Fmoc/^tBu Strategie, lineare *precursor* Peptide synthetisiert, die C-terminal eine Thio-Aminosäure (Cys, cys, Tht) sowie N-terminal ein furyl-geschütztes Maleimid (**61a**, **70a**, **70c**) enthalten. Die Synthese dieser Peptide wurde ausgehend von 2-Chlortritylchlorid-Polystyrol Harz (2-CTC-PS), das mit den entsprechenden Thio-Aminosäuren vorbeladen wurde (s. Kap. 6.2 AA1), unter Standardbedingungen an einem mikrowellenunterstützten LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer der Firma CEM (s. Kap. 6.2 AA6) in einem 0.1 mM Ansatz durchgeführt (s. Schema 30). Zum Abspalten der linearen Vorläuferpeptide vom Trägermaterial wurde das Harz mit einer Mischung aus TFA und TIPS (96:4) für vier Stunden behandelt. Die hohe Zeitspanne ist notwendig um eine vollständige Entschützung der Tritylschutzgruppe der Thioamino-säuren zu gewährleisten. Anschließend wurde das Peptid in kaltem Diethylether gefällt. Nach Trocknen des Peptides am Feinvakuum wurde dies ohne weiter Aufreinigung in der Zyklisierung eingesetzt. In der vorangegangenen Masterarbeit konnte bereits gezeigt werden, dass die Zyklisierung der Hexapeptide in einer *one pot* retro-DIELS-ALDER-Reaktion mit anschließender thio-MICHAEL-Addition in *n*-Butanol als Lösungsmittel erfolgreich durchgeführt werden kann.^[165,166]



Schema 30: Synthese der zyklischen Hexapeptide **91-95**, ausgehend vom 2-CTC-Harz, das mit den entsprechenden Thio-Aminosäuren vorbeladen wurde **88-90**. Die Festphasenpeptidsynthese der linearen Vorläuferpeptide wurde an einem mikrowellenunterstützten LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer durchgeführt. Das lineare Peptid wurde nach der Abspaltung vom Trägerharz (TFA/TIPS; 96:4) ohne weitere Aufreinigung in der Zyklisierung eingesetzt. Diese tritt bei 120 °C in verdünnter Lösung mit einer Konzentration von 1 mM nach einer retro-DA-Reaktion der furyl-geschützten N-terminalen Maleimide, durch den nukleophilen Angriff des Thiols an die Maleimid-Doppelbindung ein.^[166]

Um die Bildung von Oligomeren während der Zyklisierung zu vermeiden, wurde diese mit einer Peptidkonzentration von 1-3 mM durchgeführt. Die Verwendung von *n*-Butanol als Lösungsmittel für diese Reaktion hat dabei zwei Vorteile: der Siedepunkt von 118 °C stimmt genau mit der erforderlichen Temperatur für die retro-DIELS-ALDER-Reaktion überein und durch den relativ geringen Dampfdruck kann das Lösungsmittel einfach und schnell durch Umkondensieren entfernt werden. Während der Zyklisierung wird Furan freigesetzt, dass auf Grund seines niedrigen Siedepunktes von 32 °C aus der Reaktionslösung ausgetrieben wird. Der nukleophile Angriff des Thiols an die nach der retro-DA-Reaktion wieder zugänglichen Maleimid-Doppelbindung kann sowohl aus dem vorderen als auch aus dem hinteren Halbraum stattfinden, wodurch die Bildung von zwei Diastereomeren Hexapeptiden möglich ist. Die Auswertung der analytischen HPLC-Chromatogramme der zyklisierten Peptide vor der Aufreinigung zeigte in allen Fällen ein nahezu 1:1 Verhältnis der beiden Diastereomere (vgl. Abbildung 18).

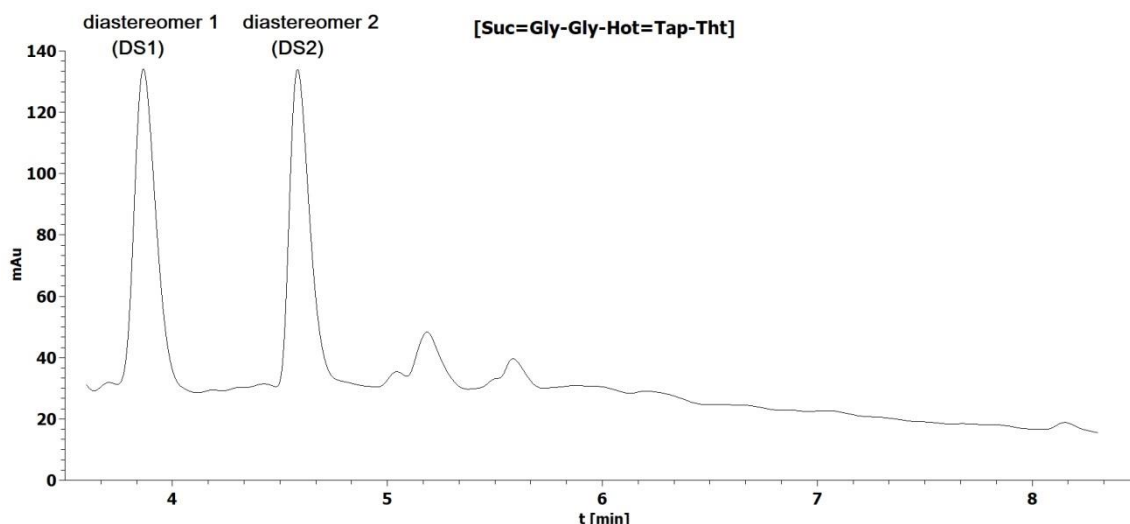


Abbildung 18: RP-HPLC-Chromatogramm des Rohpeptides **95** nach der Zyklisierung. Die beiden Diastereomere DS1 und DS2, die durch die thio-MICHAEL Addition gebildet werden, unterscheiden sich deutlich in ihrer Retentionszeit und können somit mittels präparativer RP-HPLC voneinander getrennt werden.

Dieser Befund zeigt, dass die bereits vorhanden Stereozentren innerhalb der linearen Vorläuferpeptide keinen Einfluss auf die Stereoselektivität für den intramolekularen nukleophilen Angriff des Thiols am Maleimid aufweisen. Weiterhin war ersichtlich, dass die hohen Temperaturen während der retro-DA-Reaktion keine Epimerisierung der vorhanden Stereozentren innerhalb des Peptides zur Folge haben, womit sich diese Methode sehr gut eignet um zyklische Hexapeptide darzustellen. Die beiden Diastereomere der jeweiligen Hexapeptide wurden mittels präparativer RP-HPLC voneinander getrennt und mit Hilfe der NMR-Spektroskopie weiter untersucht.

3.1.4 Konformationsanalyse der zyklischen Hexapeptide

Nach Trennung der Diastereomere der zyklischen Hexapeptide wurde eine Konformationsanalyse mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten durchgeführt. Trotz der signifikant unterschiedlichen Signalsätze der einzelnen Diastereomerenpaare konnten keine charakteristischen chemischen Verschiebungen, Kopplungskonstanten oder NOE-Kontakte identifiziert werden, die es erlauben würden eine Aussage über die Stereokonfiguration am Succinimid-Ring treffen zu können. Auch Kristallisationsversuche der Hexapeptide blieben erfolglos. Aus diesem Grund werden die zyklischen Hexapeptide im Folgenden gemäß ihrer Retentionszeit im RP-HPLC-Chromatogramm mit Diastereomer 1 (DS1), für das polarere und somit früher eluierende Hexapeptid bzw Diastereomer 2 (DS2), für das unpolarere Hexapeptid, bezeichnet. In den Abbildungen 19 und 20 werden die ^1H -NMR-Spektren im aliphatischen Bereich zwischen 2.30 und 5.60 ppm der jeweils ersten bzw. zweiten Diastereomere miteinander verglichen.

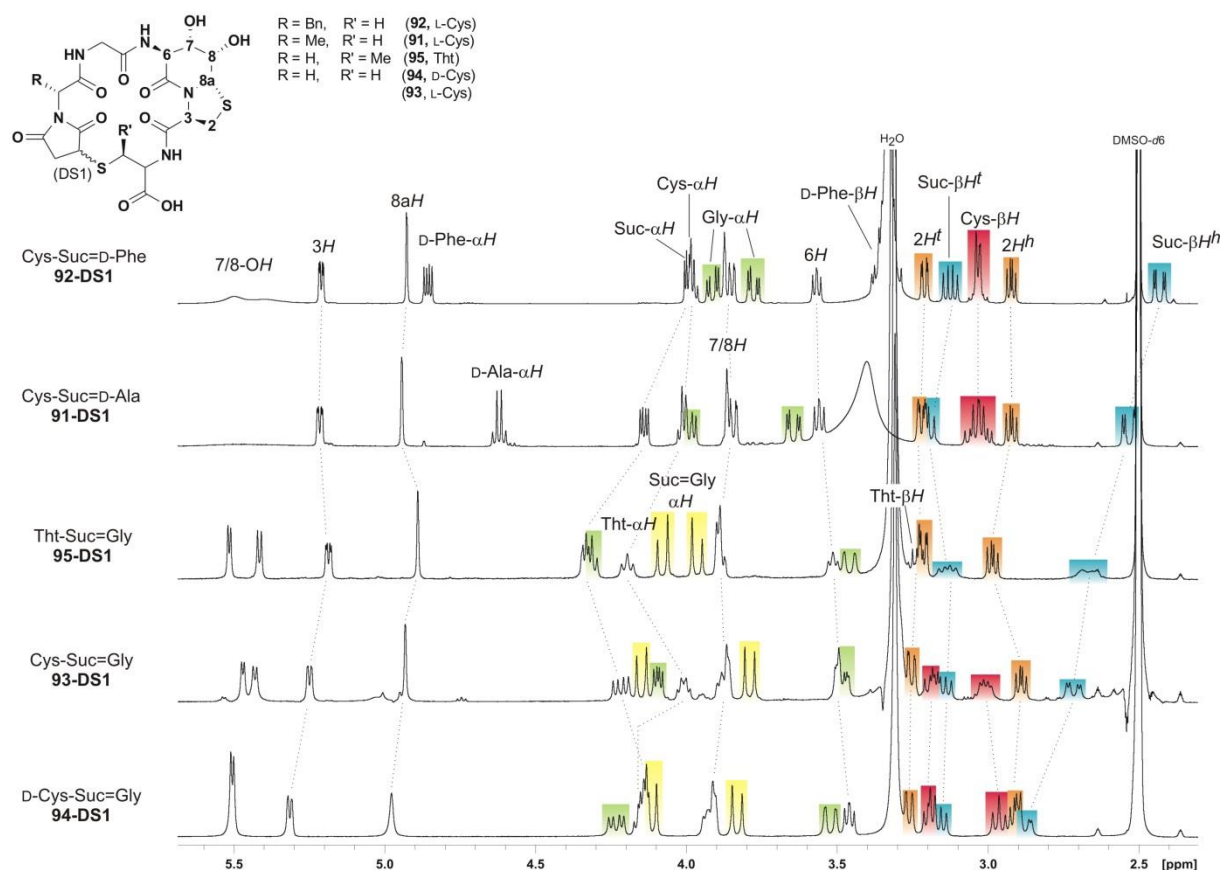


Abbildung 19: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (500 MHz, 300K, DMSO- d_6) im aliphatischen Bereich der jeweils ersten Diastereomere aller zyklischen Hexapeptide. Die diastereotopen Protonenpaare sind farblich hinterlegt und verdeutlichen die charakteristische Signaldispersion.

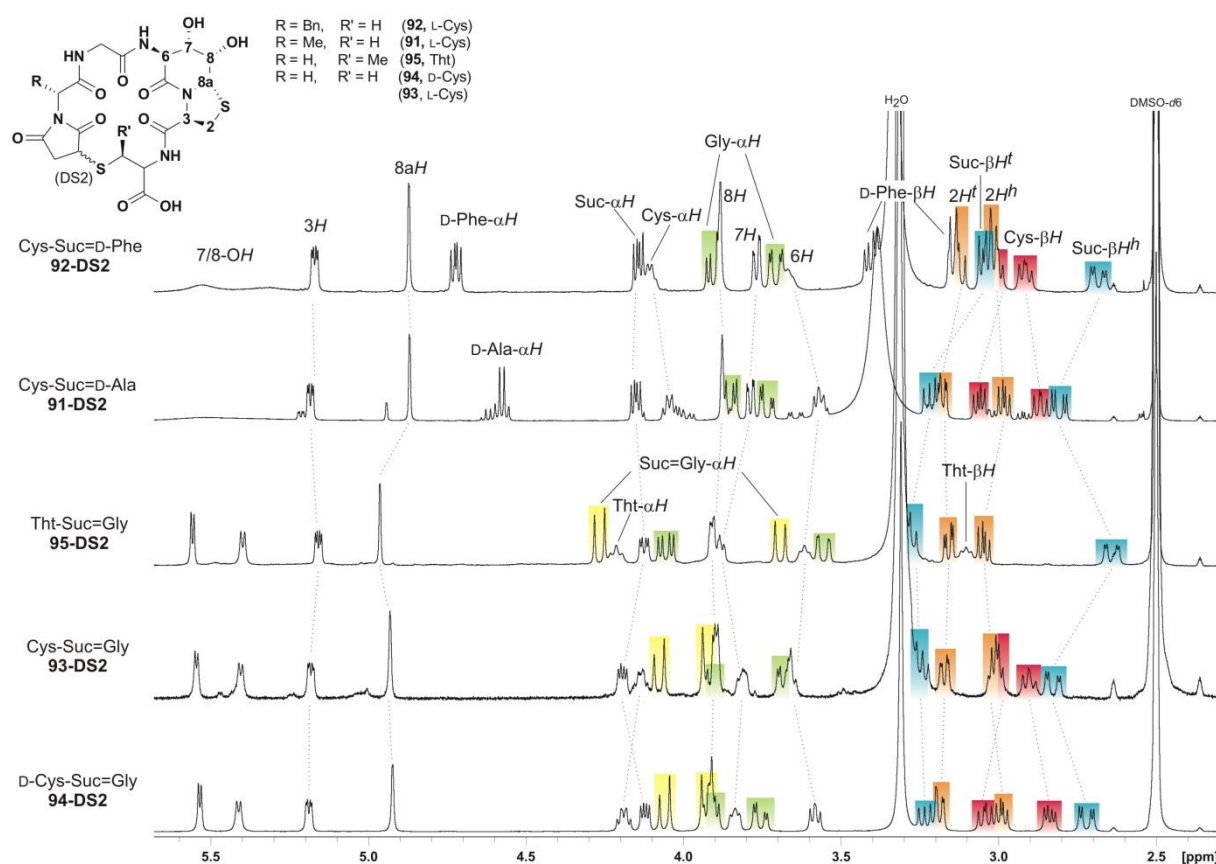


Abbildung 20: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (500 MHz, 300K, DMSO-d_6) im aliphatischen Bereich der jeweils zweiten Diastereomere aller zyklischen Hexapeptide. Die diastereotopen Protonenpaare sind farblich hinterlegt und verdeutlichen die charakteristische Signaldispersion.

Die insgesamt betrachtete große Ähnlichkeit in den chemischen Verschiebungen der Signale offenbart bei genauerem Betrachten insbesondere bei der Dispersion der diastereotopen Protonen signifikante Unterschiede. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Unterschiede und Gemeinsamkeiten bezüglich der diastereotopen Protonenpaare aller zyklischen Hexapeptide, die das Suc=Gly-Strukturmotiv beinhalten. Hierbei lassen sich deutliche Trends für die Dispersion der diastereotopen Protonenpaare erkennen.

Tabelle 3: $\Delta\delta$ -Werte [ppm] der diastereotopen Protonenpaare aller Hexapeptide (93-95) mit Suc=Gly-Motiv.

Proton	D-Cys Suc=Gly 94-DS1	D-Cys Suc=Gly 94-DS2	L-Cys Suc=Gly 93-DS1	L-Cys Suc=Gly 93-DS2	Tht Suc=Gly 95-DS1	Tht Suc=Gly 95-DS2
Hot=Tap-2H	0.35	0.19	0.26	0.15	0.23	0.11
Gly- αH	0.71	0.14	0.74	0.23	0.86	0.50
Cys- βH	0.24	0.20	0.17	0.12	-	-
Suc=Gly- αH	0.30	0.14	0.36	0.15	0.12	0.57
Suc- βH	0.28	0.50	0.44	0.42	0.47	0.65

Besonders interessant ist dabei die teils deutlich größere Dispersion der diastereotopen Protonen der DS1-Diastereomere im Vergleich zu den Werten der DS2-Hexapeptide. Dies spricht für eine stärkere Population und somit stabilere Vorzugskonformation dieser Hexapeptide. Weiterhin zeigen nur die Diastereomere der Hexapeptide (**93**, **94**) mit dem flexiblen Cys/cys-Suc=Gly-Motiv (vgl. Abbildung 17) innerhalb des Peptidrückgrates einen konsistenten Trend der Dispersion. Für dieses Peptide kann die allgemein gültige Aussage für die diastereotope Aufspaltung aller diastereotopen Protonenpaare $\Delta\delta_{DS1} > \Delta\delta_{DS2}$ formuliert werden. Bemerkenswerter Weise kehrt sich dieser Trend durch das Einführen eines weiteren Stereozentrums in C-Terminaler Nachbarschaft zum Succinimid-Ring, wie es bei dem Tht-Hexapeptid **95** der Fall ist, nur für die diastereotopen Protonenpaare der Suc=Gly-Dipeptideinheit um. Dies deutet auf eine signifikante Änderung in der räumlichen Vorzugskonformation des Succinimid-Rings bei den Diastereomeren dieses Hexapeptides hin. Durch die Einführung einer Suc=D-Xaa Dipeptideinheit (Xaa = phe, ala) in die zyklischen Hexapeptide sollte eine zusätzliche Stabilisierung der Konformation erreicht werden. Überraschenderweise zeigte die Auswertung der ^1H -NMR-Spektren, dass die Peptide **91** und **92** die im Vergleich zu allen anderen zyklischen Hexapeptiden (**93-95**) durchschnittlich geringste Dispersion der diastereotopen Protonenpaare aufweisen (s. Tabelle 4). Weiterhin zeigen diese Peptide genau wie schon das Tht-Hexapeptid **95** keine konsistenten Trends bezüglich der Dispersion. Jedoch besitzen die ersten Diastereomere der Hexapeptide **91** und **92** die mit Abstand größten Werte für die diastereotope Aufspaltung bei den Succinimid- β -Protonen. Dies deutet auf einen starken Einfluss des D-konfigurierten Stereozentrums der Suc=D-Xaa Dipeptideinheiten auf die Vorzugskonformation des Succinimid-Rings hin.

Tabelle 4: $\Delta\delta$ -Werte [ppm] der diastereotopen Protonenpaare aller zyklischen Hexapeptide mit Suc=D-Xaa-Motiv.

Proton	L-Cys Mal=phe 92-DS1	L-Cys Mal=phe 92-DS2	L-Cys Mal=ala 91-DS1	L-Cys Mal=ala 91-DS1
Hot=Tap-2H	0.30	0.14	0.29	0.12
Gly- α H	0.14	0.20	0.35	0.14
Cys- β H	0.02	0.13	0.05	0.20
phe- β H	0.06	0.28	-	-
Suc- β H	0.70	0.34	0.67	0.40

Leider konnte mit Hilfe von ROESY-NMR-Spektren keine weitere Aussage über die Konformation des Succinimid-Ringes getroffen werden, da weder das Suc- α H noch die beiden Suc- β H ROE-Kontakte zu benachbarten Protonen aufwiesen. Allerdings zeigte die zur Ligation

notwendige Thioamino­säure für die jeweiligen Diastereomere einen einheitlichen Trend in den Seitenkettenrotameren (s. Abbildung 21).

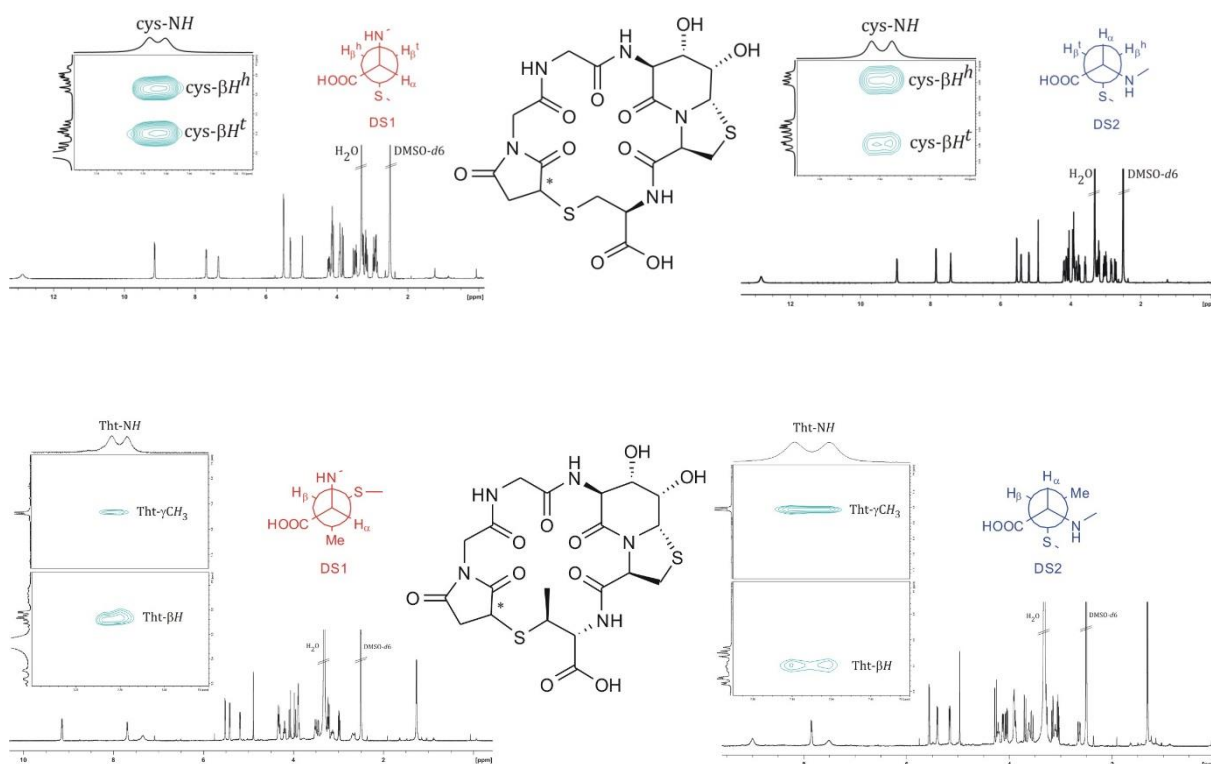


Abbildung 21: Auschnitte aus den ROESY-NMR-Spektren (500 MHz, 300 K, DMSO-d₆, 300 ms) der Hexapeptide **94** und **95**. Gezeigt sind die ROE-Kontakte zwischen dem Amidproton der Thioamino­säure und die Substituenten am β-Kohlenstoffatom. Die aus den ROE-Kontakten resultierende *Newman*-Projektion der Seitenkette der Thioamino­säure ist für die jeweils ersten Diastereomere (DS1, links) bzw. für die zweiten Diastereomere (DS2, rechts) identisch. Dieser Trend gilt für alle hier beschriebenen zyklischen Hexapeptide (**91-95**).^[166]

Zwar kann mit Hilfe der ROESY-Spektren eine eindeutige Vorzugskonformation für die Seitenkettenrotamere der Thioamino­säuren (Cys, cys, Tht) beschrieben werden, jedoch steht diese im Kontrast zu den aus dem ¹H-NMR extrahierten Kopplungskonstanten, die bei beiden Rotameren nahezu identische Werte aufweisen und sich nicht in dem Maße unterscheiden, wie es für diese unterschiedlichen Rotamere zu erwarten wäre. Um dennoch einen Einblick zu bekommen, welche Konformation von den Diastereomeren letztendlich eingenommen wird, wurden anhand der erhobenen NMR-Daten für das zyklische Hexapeptid **93** computerbasierte Modellrechnungen (*simulated annealing calculations*) in Kooperation mit PHILIP HORX durchgeführt.^[166,200] Die in Abbildung 22 dargestellten Modelle der beiden Diastereomere **93-DS1** und **93-DS2** zeigen, dass der Hauptunterschied in der Ausrichtung des Succinimid-Ringes liegt. Für das Diastereomer mit einer (*R*)-Konfiguration am Succinimid-Ring befindet sich der β-Kohlenstoff des Succinimid-Ringes oberhalb der Ebenen des Peptidrückgrates und gegenüberliegend zum bzyklischen Hot=Tap.

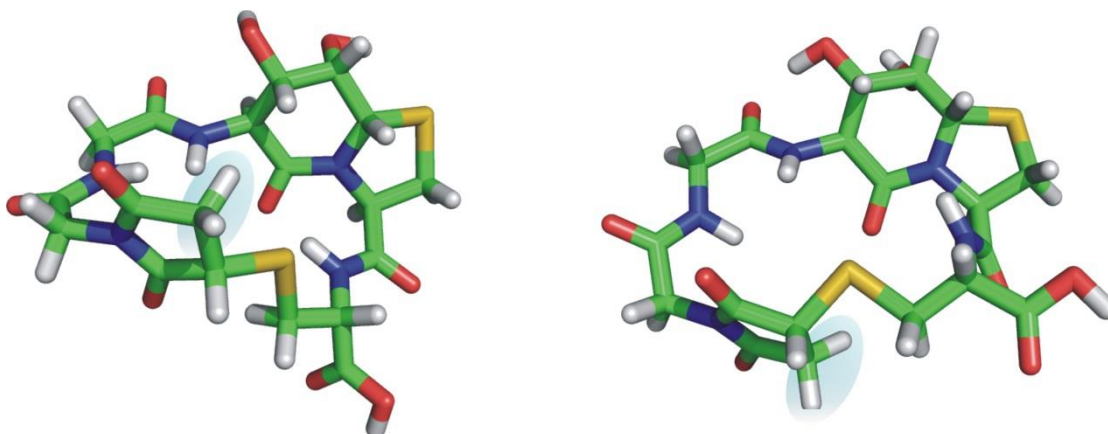


Abbildung 22: Auf NMR-Daten basierte, berechnete Struktur der beiden Diastereomere des zyklischen Hexapeptides **93**. **Links:** Struktur für das Diastereomer mit einem (*R*)-konfiguriertem Stereozentrum am Succinimid-Ring. Der β -Kohlenstoff (blau hinterlegt) des Succinimid-Ringes befindet sich oberhalb der Ebene des Peptidrückgrates wodurch das Peptid eine wannenartige Konformation einnimmt. **Rechts:** Das Diastereomer mit (*S*)-konfiguriertem Stereozentrum am Succinimid-Ring führt zu einer sesselartigen Konformation des Peptides, bei dem sich der β -Kohlenstoff des Succinimid-Ringes unterhalb der Ebene des Peptidrückgrates befindet.^[166]

Hierdurch nimmt das Hexapeptid eine wannenartige Konformation ein. Im Falle des Diastereomers mit einem (*S*)-konfigurierten Stereozentrum am Succinimid-Ring liegt der β -Kohlenstoff unterhalb der Ebene des Peptidrückgrates, wodurch das Peptid eine sesselartige Konformation einnimmt. Ein weiteres interessantes Detail liegt in den Diederwinkeln des Succinimid-Rings. Diese liegen für den Winkel ϕ zwischen 108° und 115° sowie 176° und 179° für den Diederwinkel ω . Diese sind nahezu identisch mit den von CAPASSO *et al.* beschriebenen Werten für die Diederwinkel des Aminosuccinimid-Rings innerhalb eines $\beta II'$ -turns (vgl. Kap. 1.3). Der signifikanteste Unterschied der Diastereomere tritt jedoch erst bei einer Langzeitbeobachtung mittels NMR-Spektroskopie zu Tage. Hier offenbart sich die Stereodynamik der Succinimid-Thioether.^[165,166]

3.1.5 Stereodynamik der zyklischen Hexapeptide

Bei der Beobachtung der einzelnen Diastereomere über einen längeren Zeitraum tritt ein bemerkenswertes Verhalten auf. Dieses wurde erstmals während der Messung der 2D-NMR-Experimente für das erste Diastereomer des zyklischen Hexapeptides **93-DS1** registriert. Die Messdauer dieser Experimente betrug insgesamt über 12 Stunden. Während den in der Messreihenfolge später angesiedelten 2D-Messungen des entantiomerenreinen Peptides erschien ein zweiter Signalsatz, der nach weiterführenden Analysen dem zweiten Diastereomer **93-DS2** zugeordnet werden konnte. Dieses zeitabhängige stereodynamische Verhalten wurde

weitergehend mittels ^1H -NMR-Spektroskopie über einen Zeitraum von 42 Tagen für alle zyklischen Hexapeptide untersucht. So konnte für das zyklische Hexapeptid **94** mit D-Cystein an der Ligationstelle als auch für das Tht-Hexapeptid **95** dieses Verhalten bei jeweils beiden Diastereomeren nachgewiesen werden. Abbildung 23 verdeutlicht diesen Befund am Beispiel des zyklischen Hexapeptides **94**.

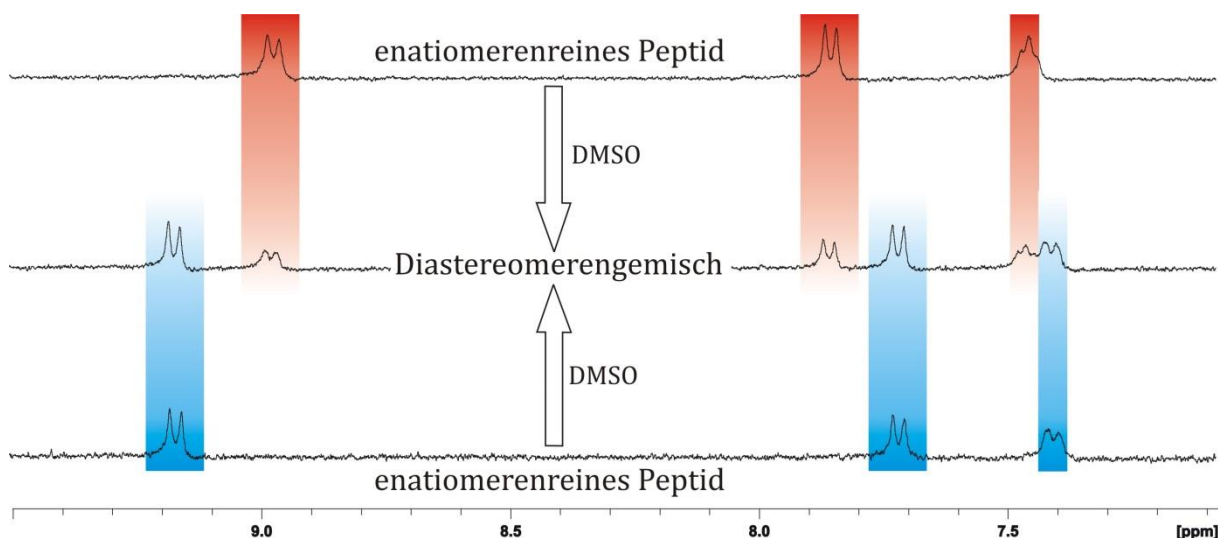


Abbildung 23: Die zeitabhängige Stereodynamik der enantiomerenreinen, zyklischen Hexapeptide resultiert in einem definierten Verhältnis beider Diastereomere, die zuvor mittels präparativer RP-HPLC voneinander getrennt wurden. Verdeutlicht hier anhand der Resonanzsignale der Amidprotonen im ^1H -NMR-Spektrum (500 MHz, 300 K, DMSO- d_6) der beiden Diastereomere des zyklischen Hexapeptides **94** (oben: DS2, unten: DS1).

Die Epimerisierungsrate wurde durch Integration der neuen Signalsätze im ^1H -NMR-Spektrum anhand gut separierten Hot=Tap-3H oder Hot=Tap-8aH Protonen als Referenzsignal für die Integration bestimmt.^[166] Interessanterweise zeigten alle Diastereomere der zyklischen Hexapeptide **91** und **92** mit einem Suc=D-Xaa-Baustein innerhalb des Peptidrückgrates keinerlei Veränderung während dieser Zeitspanne. Auf diesen Sachverhalt wird später in diesem Kapitel noch genauer eingegangen.

Eine weitere ungewöhnliche Eigenschaft der Hexapeptide, die ein stereodynamisches Verhalten aufweisen, ist das Erreichen eines thermodynamischen Gleichgewichts zwischen den beiden Diastereomeren bei einem Verhältnis von DS1/DS2 mit 3:1. Dieses Verhältnis ist konsistent für alle hier untersuchten zyklischen Hexapeptide (**93-95**). Hierdurch wird deutlich, dass das jeweils erste Diastereomer der Hexapeptide eine stabilere und dominantere Vorzugskonformation aufgrund seiner Stereokonfiguration am Succinimid-Ring besitzt. Allerdings hängt die Epimerisierungsgeschwindigkeit zum Erreichen dieses Gleichgewichtes extrem stark von der Konfiguration der restlichen Stereozentren des Peptidrückgrates ab.

Abbildung 24 zeigt die unterschiedlichen Epimerisierungsgeschwindigkeiten der Diastereomere der hier untersuchten zyklischen Hexapeptide.

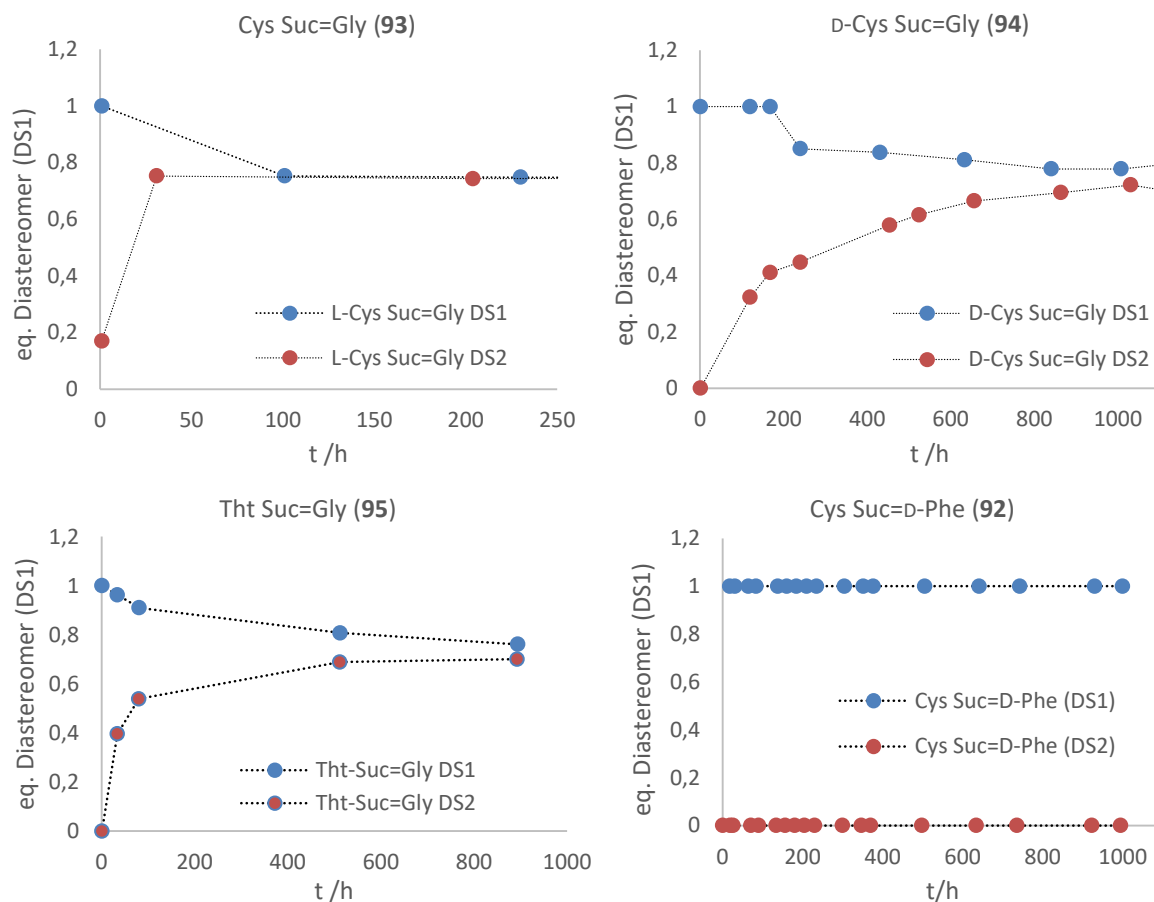


Abbildung 24: Dargestellt ist die Epimerisierungsrate aller Diastereomere der zyklischen Hexapeptide **92-95** in Abhängigkeit der Zeit. Hieraus wird schnell ersichtlich, dass im Falle der Hexapeptide, die einem stereodynamischen Verhalten unterliegen, die Stereozentren des Peptidrückgrates einen starken Einfluss auf die Geschwindigkeit bis zum Einstellen des thermodynamischen Gleichgewichtes bei einem Verhältnis von 3:1 zwischen den jeweiligen Diastereomeren haben. Die Diastereomere des zyklischen Hexapeptides **92** mit dem Suc=D-Phe-Dipeptidbaustein sind über den gesamten beobachteten Zeitraum stabil. Gleiches trifft auch auf das Suc=D-Ala-Hexapeptid **91** zu.^[166]

Werden diese Werte nun im Detail betrachtet, zeigt sich, dass die Flexibilität des Rückgrates der Hexapeptide weniger bedeutend ist als die Stereokonfiguration der C- und N-terminal zum Succinimid-Ring benachbarten Stereozentren. So liegt die Epimerisierungsrate bis zu einem Umsatz von 50% für das erste Diastereomer des L-Cystein Hexapeptides **93-DS1** mit dem Suc=Gly-Dipeptid um den Faktor 4 höher als für das D-Cystein Peptid **94-DS1**. Interessant ist, dass die Einführung des L-*allo*-Thiothreonins in das Peptidrückgrat im Falle des ersten Diastereomers **95-DS1** zwar die Epimerisierungsrate im Vergleich zum L-Cystein Hexapeptid **93-DS1** um den Faktor 2 verlangsamt aber immernoch um den Faktor 2 schneller ist als das deutlich flexiblere D-Cystein Zyklopeptid **94-DS1**. Dieses Ergebnis zeigt, dass der Tht-Baustein **72** durch seinen eingeschränkten konformativen Raum die Rigidität des

Hexapeptides **95** im Vergleich zu dem L-Cystein Hexapeptid **93** erhöht und einen stabilisierenden Effekt auf die Konformation hat. Dennoch hat die Stereokonfiguration des α -Stereozentrums der Thioaminosäure einen noch stärkeren Einfluss auf die Epimerisierungsgeschwindigkeit. In Tabelle 5 sind die Epimerisierungszeiten für alle Diastereomere aufgelistet, die zum Erreichen eines 50%igen Umsatzes benötigt werden.

Tabelle 5: Vergleich der benötigten Epimerisierungszeiten der jeweiligen Diastereomere der zyklischen Hexapeptide um einen Umsatz von 50% zu erreichen.

Peptid	$t_{1/2}$ DS1 [h]	$t_{1/2}$ DS2 [h]
zyklo[Suc=Gly-Gly-Hot=Tap-L-Cys] (93)	50	15
zyklo[Suc=Gly-Gly-Hot=Tap-Tht] (95)	100	30
zyklo[Suc=Gly-Gly-Hot=Tap-D-Cys] (94)	200	140
zyklo[Suc=D-Xaa-Gly-Hot=Tap-L-Cys] (91, 92)	>1000	>1000

Den stärksten Einfluss auf die Epimerisierung hat jedoch das Stereozentrum in C-terminaler Richtung zum Succinimid-Ring. Durch die Einführung der D-konfigurierten Suc=D-Xaa-Dipeptideinheiten (**91, 92**) kann die Epimerisierung der Diastereomere trotz der Verwendung von L-Cystein an der Ligationsstelle über einen Zeitraum von über 42 Tagen vollständig unterdrückt werden. Somit bestätigt sich die zuvor getroffene Annahme, dass eine D-Aminosäure in der $i+2$ -Position des β -turns der zyklischen Hexapeptide einen stabilisierenden Effekt auf die Struktur hat.

Ferner konnte der für die Epimerisierung zugrundeliegende Mechanismus mit Hilfe der NMR-Spektroskopie auf eine Enolisierung des Succinimid-Ringes zurückgeführt werden. Hierzu wurde das zyklische Hexapeptid **94-DS1** in D₂O gelöst und über einen Zeitraum von 168 Stunden vermessen (s. Abbildung 25). Durch die Vermessung des Peptides in D₂O, wird das acide Proton des Succinimid-Ringes nach der Enolisierung gegen Deuterium ausgetauscht. Der Nachweis für die Deuterierung an der Stelle des aciden Protons kann im ¹H-NMR-Spektrum durch die Auslöschung des Integrals des Suc- α H sowie dem Verlust der ³J-Kopplung zu den benachbarten diastereotopen Suc- β H nachvollzogen werden (s. Abbildung 25). Dieses Experiment beweist, dass die Epimerisierung der Diastereomere unter Enolisierung und anschließender Stereoinversion des Suc- α -Stereozentrums verläuft. Für diese Stereoinversion können zwei Fälle betrachtet werden, unter welchen Bedingungen die Reprotonierung der Enolatzwischenstufe abläuft. Bei einer klassischen Epimerisierung über ein Enolat erfolgt die Reprotonierung auf der Rückseite des zuvor abstrahierten aciden Protons.

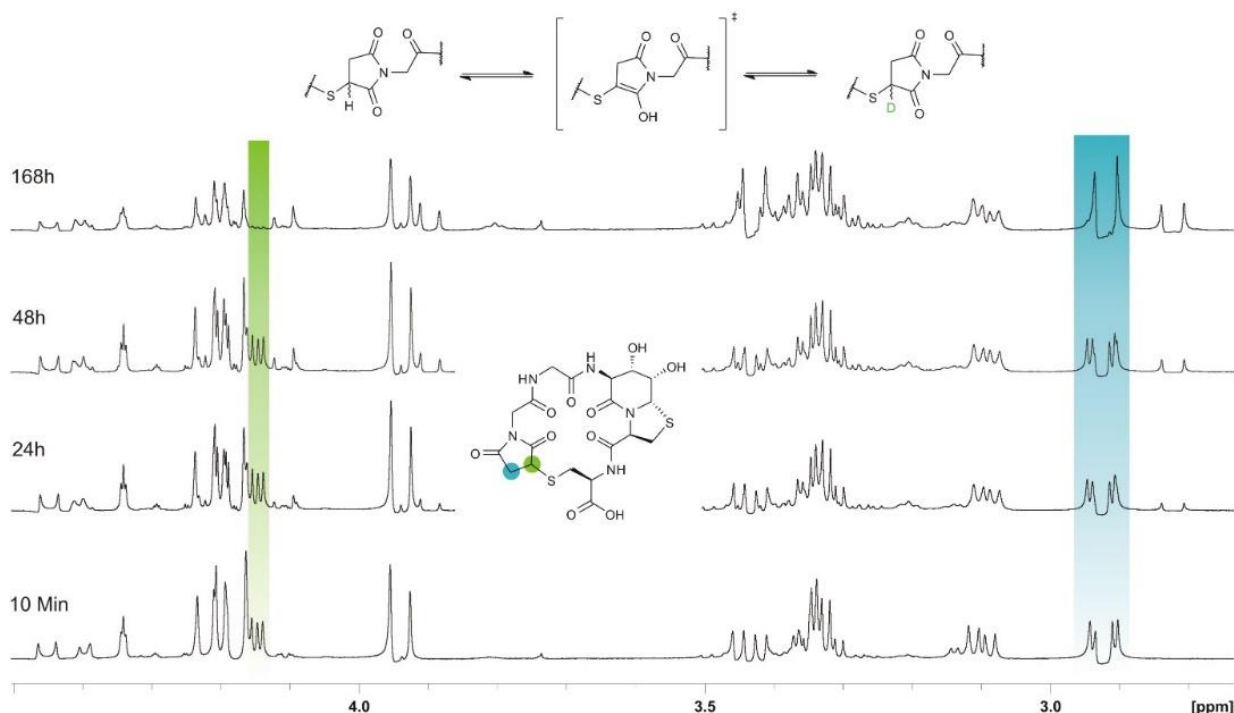
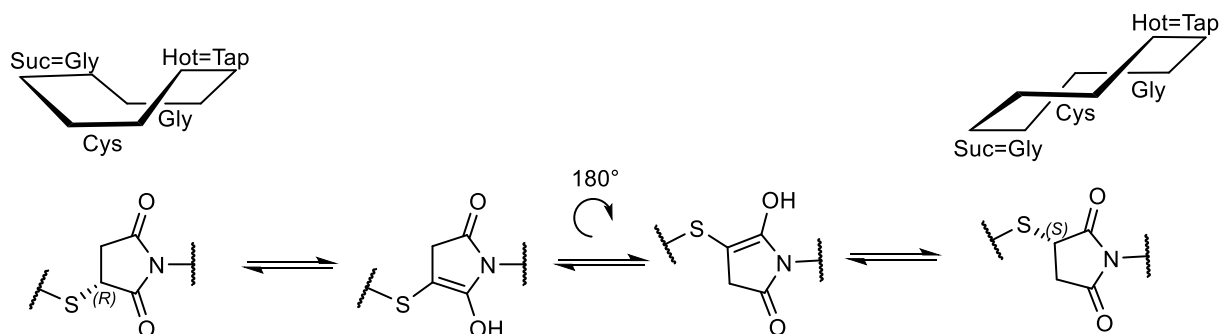


Abbildung 25: ^1H -NMR (600 MHz, 300 K, D_2O) des zyklischen Hexapeptides **94-DS1**. Zeitlicher Verlauf des Deuteriumaustausches des aciden Suc- αH (**links**) und dem damit einhergehende Verlust der 3J -Kopplungskonstante zu den diastereotopen Protonenpaaren des Succinimid-Ringes (**rechts**). Dieses Experiment beweist, dass die Epimerisierung der zyklischen Hexapeptide über eine Enolisierung des Succinimid-Ringes verläuft.^[166]

Unter Berücksichtigung der Konformation der zyklischen Hexapeptide (vgl. Abbildung 22) ist dieser Reaktionsweg jedoch auf Grund der sterischen Hinderung sehr unwahrscheinlich. Weiterhin liegt der größte Unterschied beider Diastereomere in der Ausrichtung des Succinimid-Ringes ober- oder unterhalb der Ebene des Peptidrückgrates. Dieser Befund legt nahe, dass die Enolatzwischenstufe auf Grund des sp^2 -hybridisierten Kohlenstoffs an der α -Position des Succinimids eine geringere Rotationsbarriere um die C-S - und C-N -Bindung im Vergleich zum sp^3 -Kohlenstoff aufweist und somit der Succinimid-Ring in der Enolform eine 180° Drehung vollziehen kann.



Schema 31: In Verbindung mit den in Abbildung 22 dargestellten, berechneten Modellen für die Konformation der zyklischen Hexapeptide, ergibt sich für die Enolisierung, und anschließende Epimerisierung der Hexapeptide der Rückschluss, dass diese über eine 180° Rotation der C-S - und C-N -Bindung des Succinimid-Ringes verläuft.

Durch eine anschließende Reprotonierung von der gleichen Seite, von der auch das acide Proton abstrahiert wurde, kann auf diesem Wege trotzdem eine Stereo-inversion stattfinden (s. Schema 31).

Es konnte gezeigt werden, dass die Konformation des makrozyklischen Ringes einen starken Einfluss auf die Acidität des Suc- α H und somit auf die Neigung des Succinimid-Ringes zur Enolisierung hat. Daher stellte sich die Frage, ob auch die Diastereomere der zyklischen Suc=D-Xaa Hexapeptide **91** und **92**, die keiner Epimerisierung unterliegen, eine nachweisbare Acidität oder Tendenz zur Enolisierung aufweisen. Um dem nachzugehen wurden die Diastereomere des Hexapeptides **92** in einem 1:12 Gemisch aus D₂O und DMSO-*d*₆ über einen Zeitraum von 62 Tagen mit Hilfe der ¹H-NMR-Spektroskopie beobachtet (s. Abbildung 26).

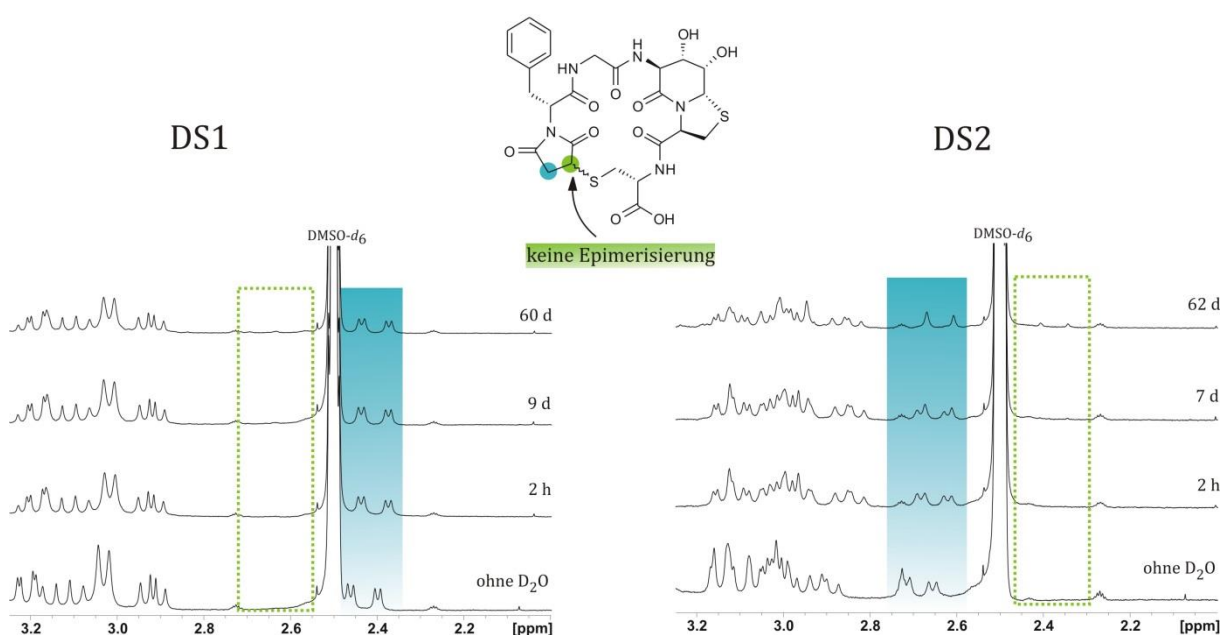


Abbildung 26: ¹H-NMR (unten: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆; oberhalb des ersten: 300 MHz, 300 K, D₂O/DMSO-*d*₆, 1:12), Zeitlicher Verlauf des Deuteriumaustausches des aciden Suc- α H der stabilen Diastereomere des zyklischen Hexapeptides **92**. Nach der Zugabe von D₂O zu der in DMSO-*d*₆ gelösten NMR-Probe wird bei dem zweiten Diastereomer **92-DS2** (rechts) eine Enolisierung des Succinimid-Ringes beobachtet, die anhand des Verlustes der ³J-Kopplungskonstante des Suc- β H nachgewiesen werden kann (blau hinterlegt). Das erste Diastereomer **92-DS1** (links) unterliegt hingegen keiner Enolisierung des Succinimid-Ringes.^[166] Wie bereits zuvor beschrieben unterliegen auch unter diesen Bedingungen die beiden Diastereomere keiner Epimerisierung (grün).

Das verblüffende Ergebnis dieser Untersuchungen war, dass das erste Diastereomer **92-DS1** wie zu erwarten keiner Enolisierung unterlag, was auch im Einklang mit der zuvor beschriebenen stabilen Konformation des Hexapeptides steht. Jedoch zeigt das zweite Diastereomer **92-DS2** trotz seiner stabilen Konformation und nicht vorhandenen Tendenz zur Epimerisierung eine Enolisierung des Succinimid-Ringes. Dies bedeutet, dass die Stereokonfiguration des Suc=D-Phe-Dipeptides einen so dominanten Einfluss auf die gesamte Konformation des

18-gliedrigen Hexapeptidringen von **92-DS2** hat, dass die Enolatzwischenstufe nicht die zur Epimerisierung notwendige 180° Rotation um die C-S- und C-N-Bindung des Succinimides vollziehen kann.

Zusammenfassend konnte in diesem Kapitel gezeigt werden, dass die Synthese von zyklischen Hexapeptiden mit einem Succinimid-Thioether innerhalb des natürlichen Peptidrückgradregisters über eine thio-MICHAEL-Addition zwischen einem Cystein-Derivat und einem Maleimid verwirklicht werden kann. Die aus dieser Reaktion resultierenden Diastereomere konnten mittels präparativer RP-HPLC getrennt und NMR-Spektroskopisch untersucht werden. Das dabei erstmals beschriebene, stereodynamische Verhalten dieser Verbindungen konnte auf eine Enolisierung des Succinimid-Ringes zurückgeführt werden. Weiterhin konnte durch die gezielte Einführung oder Inversion von Stereozentren entlang des Peptidrückgrates und der damit einhergehenden Konformationsänderung die C-H-Acidität des Succinimid-Ringes an der α -Position gesteuert werden. Des Weiteren konnte durch Langzeit NMR-Experimente gezeigt werden, dass diese Änderungen einen Einfluss auf die Epimerisierungsgeschwindigkeit der Diastereomere hat.

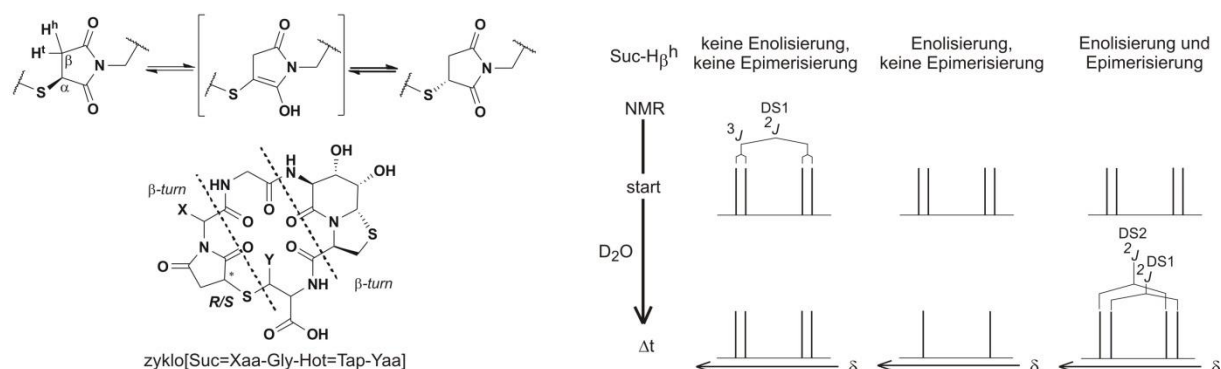


Abbildung 27: Der zugrundeliegende Mechanismus der Epimerisierung der zyklischen Hexapeptide konnte eindeutig auf eine Enolisierung des Succinimid-Ringes zurückgeführt werden. Dabei können drei Szenarien diskutiert werden, die im Rahmen dieser Arbeit beobachtet wurden. Das schematische Linienspektrum des dd-Signals der diastereotopen Suc- β H verdeutlicht dies (**rechts**). Den ersten Fall bilden die konformationsstabilen Hexapeptide, die keiner Enolisierung und keiner Epimerisierung unterliegen. Hierbei bleiben die Signalsätze im ^1H -NMR-Spektrum bei der Zugabe von D_2O unverändert. Im zweiten Fall sind die Peptide ebenfalls konformationsstabil, zeigen jedoch eine Enolisierung des Succinimid-Ringes, die sich im Verlust der 3J -Kopplung des Suc- β H manifestiert und das Signal auf ein Dublett reduziert wird. Im dritten Fall sind die Hexapeptide nicht konformationsstabil und zeigen sowohl eine Enolisierung als auch Epimerisierung.^[166]

So lassen sich für die hier untersuchten Diastereomere der zyklischen Hexapeptide drei Fälle beschreiben (s. Abbildung 27). Im ersten Fall handelt es sich um eine konformationsstabile Verbindung, die keiner Enolisierung und Epimerisierung unterliegt. Dies konnte für das Peptid **92-DS1** mit dem Suc=D-Phe Strukturmotiv gezeigt werden. Im zweiten Fall treten sowohl eine

Enolisierung und damit anschließend verbunden auch eine Epimerisierung auf. Dies trifft für die Hexapeptide **93-95** zu. In diesen Fällen liegt das thermodynamische Gleichgewicht der Epimerisierung zwischen den Diastereomeren DS1:DS2 immer bei einem Verhältnis von 3:1. Weiterhin ist die Epimerisierungsgeschwindigkeit dieser Peptide in allen Fällen bei den zweiten Diastereomeren größer im Vergleich zu den jeweiligen ersten Diastereomeren (v_{epi} : DS1<DS2). Hieraus lässt sich ebenfalls schließen, dass die Stereokonfiguration am Succinimid-Ring einen erheblichen Einfluss auf dessen C-H-Acidität besitzt. Demnach lässt sich auch hier die allgemeingültige Aussage treffen, dass die C-H-Acidität bei den ersten Diastereomeren immer geringer ist als bei den jeweiligen zweiten Diastereomeren. Der dritte und ungewöhnlichste Fall der für die zyklischen Hexapeptide beschrieben werden kann, ist eine über lange Zeit stabile Konformation, die keiner Epimerisierung unterliegt jedoch eine nachweisliche Enolisierung des Succinimid-Ringes aufweist. Dieser außergewöhnliche Fall konnte für das Hexapeptid **92-DS2** beobachtet werden.

All diese Ergebnisse stellen eine solide Basis dar, um das Strukturmotiv des Succinimid-Thioethers auch in komplexeren Umgebungen weiter zu untersuchen. In den folgenden Kapiteln wird dies anhand von *β -hairpin* Peptiden näher beleuchtet.

3.2 Methodenentwicklung zur allgemein gültigen Bestimmung der Faltungspopulation von β -hairpin-Peptiden

Nach der erfolgreichen Synthese der zyklischen Hexapeptide mit einem Succinimid-Thioether innerhalb des natürlichen Peptidrückgradregisters sollte der konformative Einfluss dieses Strukturmotives auch in β -hairpin Peptiden untersucht werden. Um eine quantitative Aussage über den Faltungsgrad der Sekundärstruktur machen zu können und somit den stabilisierenden oder destabilisierenden Charakter im Vergleich zu anderen β -hairpin Peptiden bewerten zu können sollte eine NMR-basierte, allgemein gültige Methode zur Bestimmung der Faltungspopulation entwickelt werden. Als Modellpeptid sollte dafür der isolierte β -hairpin des Foldons herangezogen werden. Die Herkunft und die Charakteristika des Foldons sowie dem Foldon β -hairpin werden im Folgenden näher erläutert.

3.2.1 Foldon β -hairpins

3.2.1.1 Bakteriophagen und das Foldon

Bakteriophagen sind die zahlreichsten Organismen in der Biosphäre.^[201] Hinsichtlich ihrer biologisch hohen Relevanz und ihren vielversprechenden Anwendungen, stellen sie ein häufig untersuchtes Modelsystem aktueller Forschung dar. An ihnen konnten bereits fundamentale Erkenntnisse über die virale Infektion, Replikation, Gen Transfer, Proteinfaltung und die Morphogenese von Viren erlangt werden. Zudem werden sie u.a. bereits in der Phagentherapie und zur Typisierung von Bakterien eingesetzt.^[201] Daher ist es umso wichtiger, weiterführende Forschung an ihnen zu betreiben, um die Komplexität dieser Viren vollständig zu entschlüsseln. Das beinhaltet nicht nur den Mechanismus von Infektionskrankheiten und deren Ausbreitung zu verstehen, sondern auch die Struktur und den Aufbau korrekt erklären zu können.

Bakteriophagen, kurz Phagen, wurden 1917 das erste Mal von dem Kanadier FÉLIX HUBERT D'HÉRELLE beschrieben.^[202] Hierbei handelt es sich um kleine, stäbchenförmige Viren, welche Bakterien oder Archaeen als Wirtszelle zur Reproduktion nutzen. Namensgebend für die *Escherichia Coli* (*E. coli*) infizierenden Phagen, war die Reihenfolge der Entdeckung der Phagen, wobei die erst entdeckte als Typ 1 (T1), die zweite als Typ 2 (T2) usw. bezeichnet wurden.

Bei der T4-Bakteriophage handelt es sich um eine Phage der Familie der *Myoviridae*. Sie gilt mit ihrer Morphologie als „Prototyp“ der Bakteriophagen und hatte in der virologischen Forschung eine wichtige Bedeutung für das Verständnis der Vermehrungsstrategie von Phagen und Viren.^[201,203,204] Der Aufbau der T-Phagen ist, gegenüber anderen Phagen, relativ komplex.

Grundlegend sind diese aus einem Schwanzstück (auch „Injektionsapparat“, *Sheat*) und einem Kopf (Kapsid) aufgebaut und weisen eine Länge von ca. 200 nm auf. Das Kapsid besteht aus 152 regelmäßigen angeordneten Proteinen (Kapsomeren), ist 111 nm lang, hat einen Durchmesser von 78 nm und weist eine leicht verzerrte ikosaedrische Struktur auf. Des Weiteren beinhaltet es die DNA, welche der Zielzelle für die Reproduktion injiziert wird. Angliedernd an den Kopf besitzt die Phage ein Halsstück (*collar*, *phage neck*), welche diesen mit der Schwanzfaser verknüpft. Am unteren Ende dieser Schwanzfaser sitzt die sogenannte Bodenplatte (*baseplate*), welche als Ankerpunkt für sechs kurze *Spikes* (*short tail fibers*, STF) und sechs lange Schwanzfibern (*long tail fibers*, LTF) dient. Das komplette Schwanzstück weist hierbei eine Größe von etwa 113x16 nm auf (s. Abbildung 28).

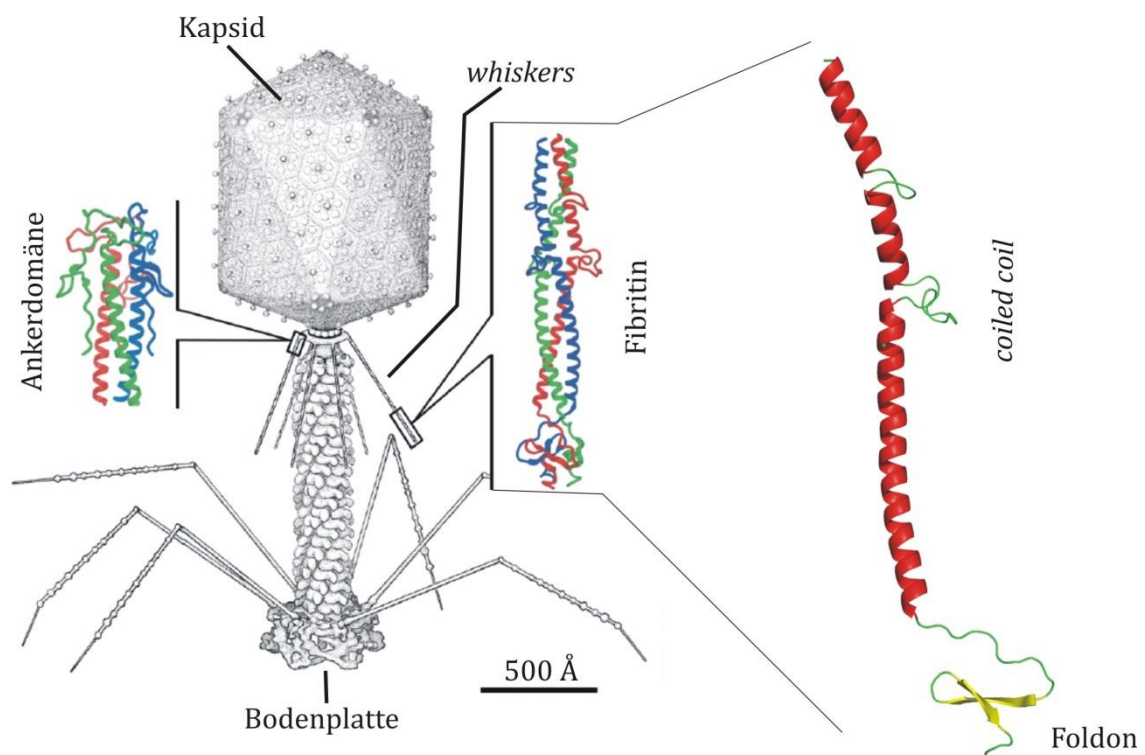


Abbildung 28: Schematischer Aufbau eines T4-Bakteriophagen.^[205] Mittig ist das Fibritin vergrößert dargestellt welches aus drei ineinander verdrehten Polypeptidsträngen besteht und eine sogenannte *coiled coil* Struktur ausbildet. Das C-Terminale Foldon ist dabei verantwortlich für die Trimerisierung und die korrekte Faltung sowie Verdrillung der Stränge ineinander. Zur Verdeutlichung ist rechts eine Monomereinheit des Fibritin E basierend auf der Kristallstruktur (PDB-code: 1AA0) dargestellt.

Die Aufgabe der sechs STF ist die dauerhafte Fixierung der Phage an der Oberfläche der Zielzelle, wohingegen die LTF's für die Erkennung des Zielrezeptors und die reversible Adsorption verantwortlich sind. Der T4-Phage weist einen recht komplizierten Aufbau auf. Das Genom der T4-Phagen besteht aus einem einzigen, doppelsträngigen DNA-Molekül, das mit einer Länge von 168.903 Basenpaare (bp) vollständig sequenziert ist.^[203] Es umfasst etwa 300 Gene und macht

ca. 48% des Gewichtes aus. Mehr als 75 dieser Gene sind für den Aufbau der Phage verantwortlich, wobei sich drei Genwirkketten bei der Morphogenese vereinigen. In jeder dieser Genwirkketten sind viele Gene hintereinander geschaltet. Eine ist zuständig dafür, dass der Kopf zusammengebaut und angeliefert wird, eine, über die das Schwanzstück mit Endplatte, aber ohne LTF's entsteht und eine letzte, über die die LTF's produziert werden.^[201,206] Der Zusammenschluss der einzelnen Teile zum jeweils übergeordneten Ganzen passiert dann letztendlich spontan durch *self assembly* oder z.T. durch sogenannte „Kittsubstanzen“. Für den ersten Schritt des Zusammenbaus wird der Kopf des Virus mit dem Schwanzstück mit Endplatte assembliert. Im nächsten Schritt werden die *long tail fibers* an der Endplatte verankert. Dies passiert in mehreren Schritten. Zunächst wird das *wac* Gen abgelesen, was als Produkt drei 480 Å lange, α -helicale Proteinstränge bildet, welche sich erneut ineinander verdrehen (*coiled-coil*). Die Voraussetzung für dieses *coiled-coil* Strukturmotiv setzt eine periodisch vorkommende, hydrophobe Aminosäure in Position eins und vier in einer siebener Abfolge von Aminosäuren voraus. Dies führt dazu, dass diese Aminosäuren ein hydrophobisches Muster auf einer Seite der α -Helix aufweisen, welche sich in der *coiled-coil* Struktur zu einem hydrophoben Kern zusammenlagern, die das Proteingerüst stabilisieren. Dieses *coiled-coil* Proteingerüst wird Fibrin genannt. Sechs von diesen Fibrinen binden mit der 46 Aminosäuren langen N-terminalen Domäne an das „*phagen neck*“ und bilden somit das *collar* aus (vgl. Abbildung 28). Der größte Teil der Fibrine stellt der zentrale Mittelteil mit 409 Aminosäuren dar. Der endständige ca. 30 Aminosäure lange C-Terminus ist essentiell für die Trimerisierung und für die korrekte Faltung sowie Verdrehung der einzelnen Polypeptidstränge ineinander.^[207]

Im nächsten Morphogeneseschritt bindet das untere Ende der trimerisierten Peptidstränge an die LTF's, wobei der C-Terminus die Bindungsstelle beeinflusst. So konnten Untersuchungen zeigen, dass Peptidstränge von Phagen mit unterschiedlichem C-Termini (Aminosäureidentität >80%) an andere Regionen der LTF's binden.^[204] Die LTF's assemblieren sich aus vier Genprodukten (gp34, gp35, gp36 und gp37), sind etwa 1600 Å lang und weisen einen Knick (*knee region*) in der Mitte auf, welche diese in einen nahen (*proximity*) und ein weiter entfernten (*distal*) Teil unterteilt. Das dünne Ende der *distal* Hälfte kann reversibel entweder mit lipopolysaccharid Rezeptoren oder mit anderen porenformenden Transmembranproteinen (Porine) der Zielzelle interagieren. Zudem verarbeitet es Informationen über die Entfernung zur Oberfläche der Zielzelle und gibt diese Informationen an die Grundplatte weiter, damit im nächsten Schritt die irreversible Bindung durch die short tail fibers erfolgen kann.^[201] Durch die räumliche Nähe der dickeren *proximity* Hälfte zur Grundplatte, können diese miteinander interagieren, wobei letztendlich das Ende der *proximity* Hälfte an die Grundplatte verankert wird. Für jede Verankerung der LTF's an die Grundplatte wird ein eigenes Fibrin benötigt.

Der C-Terminus des T4-Fibrinins ist, wie bereits beschrieben, essentiell für die Faltung und Verdrehung der einzelnen zentralen Polypeptidstränge ineinander und die daraus resultierende trimere Struktur des Fibrinins (vgl. Abbildung 28). Durch die strukturgebenden Eigenschaften der C-Terminus Domäne wurde diese daher „Foldon“ benannt.^[207] Seine native Struktur besteht aus drei einzelnen β -hairpin-Untereinheiten, welche sich durch intramolekulare Wechselwirkungen zu einer C_3 -symmetrischen, trimeren „ β -sheet Propeller“ Einheit zusammenlagern. Dabei besteht eine Monomer-Einheit aus 27 Aminosäuren (GYIPEAPRDGQAYVRKDGEWVLLSTFL), G¹ bis L²⁷. Die letzten vier C-terminalen Aminosäuren (S²⁴-L²⁷) bilden hierbei eine α -Helix (3₁₀-Helix) aus, gefolgt von einem kurzen, stark verdrehten β -hairpin. Die Aminosäuren A¹²-R¹⁵ und W²⁰-L²³ bilden dabei die beiden β -Stränge aus, die über einen β I'-turn bestehen aus den vier Aminosäuren KDGE verbknüpft sind. Der gestreckte N-Terminus (G¹-Q¹¹) des Foldon weist zwischen P⁴ und P⁷ eine linksgängige PPII-Helix auf.

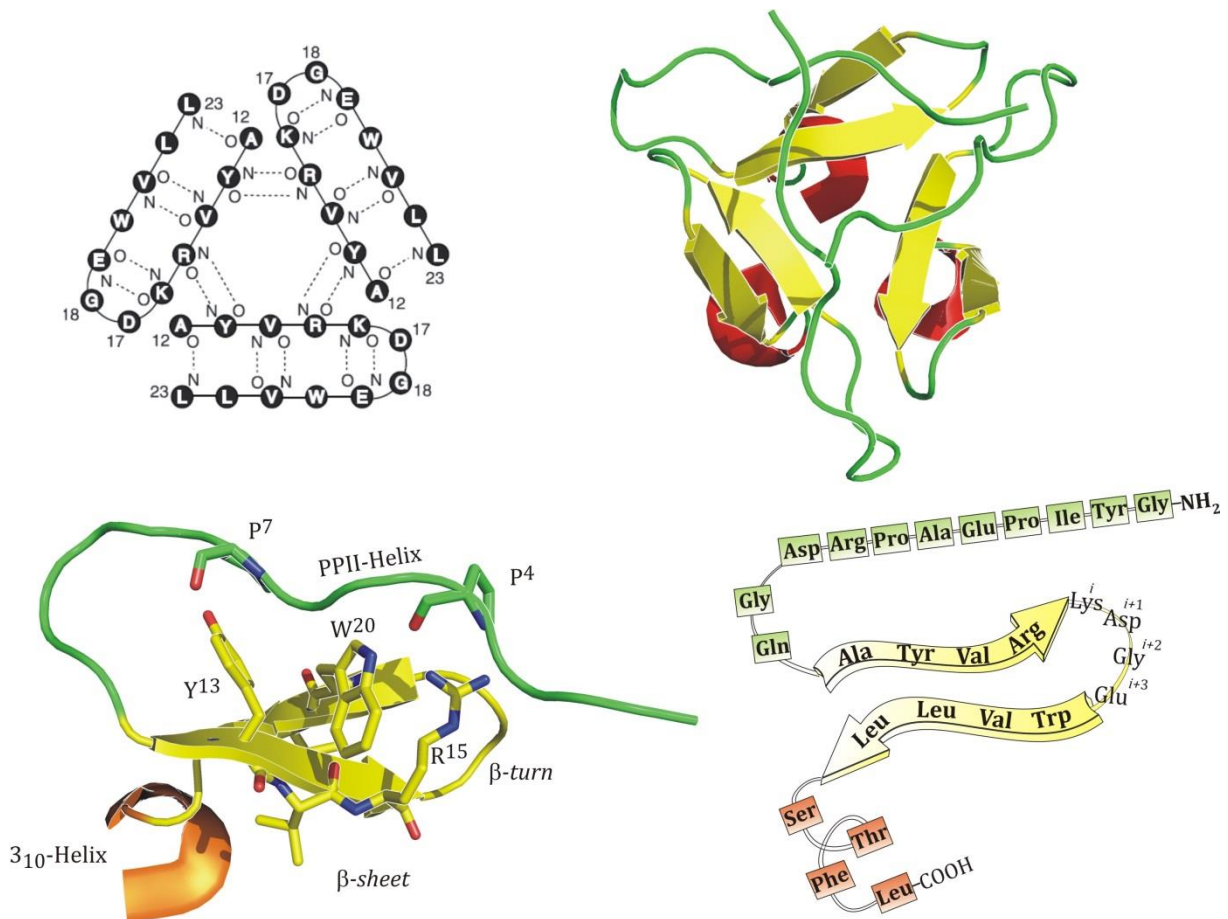


Abbildung 29: Im oberen Teil ist die Trimerstruktur des nativen Foldons anhand der Kristallstruktur (PDB-code: 1RFO, mitte) dargestellt. Diese kann vereinfacht als Tetraeder mit einer C_3 -Symmetrieachse dargestellt werden. Die charakteristischen Wasserstoffbrückenbindungen, die bei der Ausbildung der Quartärstruktur zwischen den einzelnen β -hairpins der Monomereinheiten auftreten, sind links schematisch dargestellt.^[207] Im unteren Teil ist vergrößert dargestellt die Monomereinheit des Foldons mit den einzelnen Sekundärstrukturelementen. Links sind im Bereich des β -sheets die Aminosäuren Y¹³, W²⁰ und R¹⁵ hervorgehoben. Diese bilden zusammen mit L²² den hydrophoben cluster des Foldon hairpins, der maßgeblich zur Stabilisierung der Sekundärstruktur beiträgt.

Die Wasserstoffbrückenbindungen des A¹² mit L²³, V¹⁴ mit V²¹ sowie L¹⁶ mit E¹⁹ und der diagonalen Interaktion von Y¹³ mit W²⁰ sowie weitere hydrophobe Interaktionen wirken hierbei stabilisierend und strukturgebend für den Aufbau. Durch intermolekulare Interaktionen von u.a. des Y¹³ eines Monomers mit dem R¹⁵ eines anderen Monomers, sowie einer Salzbrücke zwischen R¹⁵ und E⁵ kommt es zur Ausbildung des oben erwähnten, hoch stabilen trimeren β -sheet Propeller, welcher starke hydrophobe Eigenschaften im Inneren aufweist. Aufgrund dieser Anordnung der Monomere zu einem Trimer kommt es zur Verdrillung der zentralen α -helicalen Polypeptidstränge ineinander (*coiled coil*) (s. Abbildung 29). Kinetische Studien deuten darauf hin, dass die Trimerisierung der Monomere in einem mehrstufigen Prozess abläuft. Dabei ist die Assoziationsrate eine der schnellsten, welche bei Proteinen in Lösungen gemessen wurde.^[207] Dies lässt auf die biologisch wichtige Rolle der Foldone als Trimerisierungs-Initiator bei der Morphogenese der Phagen schließen. Enthalpie- und Entropiemessungen während der Faltung zeigen, dass in wässriger Lösung das Foldon bei Raumtemperatur in hohen Konzentrationen vorliegt. Zudem können diese bei einer Temperatur von bis zu 75 °C, sowie bis zu einem pH von ca. zwei beobachtet werden. Bei einem pH-Wert zwischen 4.3 – 1.6 kommt es zur Protonierung der Seitenkette von E⁵, was zu einem Verlust der stabilisierenden Salzbrücke zu R¹⁵ und zu einem aciden Monomer (A-State) führt. Es wird davon ausgegangen, dass dieser A-State ein früh auftretendes Intermediat bei der Trimerisierung zum Foldon darstellt. Ergänzend hierzu wird postuliert, dass während der Faltung keine weiteren Intermediate, wie Dimere, in signifikanter Stückzahl vorliegen.^[207] Die vorliegende Struktur des A-State Monomer offenbart, dass auch ohne weitere Wechselwirkungen zu einem Monomer die β -hairpin Konformation vollständig ausgebildet vorliegt und sich diese schlussfolgernd sowohl in dem A-State Monomer als auch in dem Foldon Monomer von alleine ausbildet. Dabei ist die Faltungsgeschwindigkeit zwischen dem ungefalteten und gefalteten Protein im Millisekundenbereich. Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass diese beiden Monomere sehr ähnliche bis gleiche Eigenschaften aufweisen. Dennoch besitzt das A-State Monomer keine definierten N- und C-terminalen Domänen.^[207]

3.2.1.2 Synthese der isolierten Foldon β -hairpins

Vorangegangene Arbeiten zum isolierten Foldon β -hairpin als minimale Sekundärstruktur in der Arbeitsgruppe GEYER als auch die Studien zum Foldon-Monomer von KIEFHABER *et al.* konnten zeigen, dass der zentrale Foldon β -hairpin sowohl innerhalb des Foldons als auch isoliert vom Rest der Proteinumgebung eine außerordentlich stabile Sekundärstruktur in Lösung ausbildet.^[207–210] Durch das Einführen von Dipeptidmimetika innerhalb des *turns* konnte diese Struktur noch weiter stabilisiert werden.^[209] Daher eignet sich der isolierte Foldon β -hairpin mit seinen 14 Aminosäuren (QAYVRKDGEWVLLS) besonders gut als Modellpeptid zur Untersuchung

von Konformationellen Einflüssen einzelner Mutationen auf die Sekundärstruktur. Daher sollte durch Punktmutationen innerhalb des *turn*-Bereichs des nativen Foldon β -*hairpins* ein Datensatz von Peptiden generiert werden, der es ermöglicht anhand der NMR-Spektroskopischen Daten eine Mathematische Beziehung herzuleiten um eine quantitative Aussage über die Faltungspopulation treffen zu können. Die Darstellung der Foldon β -*hairpin* Peptide erfolgte über die automatisierte und mikrowellenbeschleunigte Peptidfestphasensynthese an einem Peptidsynthesizer vom Typ LIBERTY BLUE der Firma CEM in einem 0.10 mM Ansatz. Für die Synthese wurde ein mit der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure vorbeladenes 2-Chlortritylchlorid-Harz als feste Phase verwendet. Für weitere Details sei an dieser Stelle auf den Experimentellen Teil verwiesen. Um die Löslichkeit des ansonst sehr hydrophoben Foldon β -*hairpins* zu erhöhen und somit eine hohe Konzentration für die NMR-Proben zu erreichen, wurde eine N-terminale Lysin eingeführt. Zusätzlich wurde ein C-terminales Glycin an der Sequenz angehängt, um eine gleichmäßige Anzahl an Aminosäuren innerhalb der β -Stränge des *hairpins* zu erhalten. Somit ergibt sich für den nativen Foldon β -*hairpin* die Sequenz KQ¹¹AYVRKDGEWVLLS²⁴G. Im Folgenden werden die dargestellten Sequenzen bezüglich ihrer Struktur und dem Einfluss der einzelnen Mutationen auf diese diskutiert.

3.2.1.2.1 Variation der *turn*-Aminosäuren und Ladungsmuster

Um eine möglichst große Varianz in der Stabilität des Foldon β -*hairpins* zu erreichen und somit auch den Faltungsgrad zu beeinflussen, standen besonders Mutationen des β -*turns* im Fokus.

Tabelle 6: Überblick über die Sequenzen und Ladungsmuster der synthetisierten Foldon β -*hairpins*.

Peptid	N-Term	β -turn	C-Term	Bemerkung
96	KQAYVR	K D G E ⊕ ⊖ - ⊖	WVLLSG	native Sequenz
97	KQAYVR	K N G E ⊕ ⊕ - ⊖	WVLLSG	
98	KQAYVR	K Ψ E ⊕ - - ⊖	WVLLSG	Ψ = Hot=Tap
99	KQAYVR	K Ξ E ⊕ - - ⊖	WVLLSG	Ξ = BTD
100	KQAYVR	K D G Q ⊕ ⊖ - ⊕	WVLLSG	
101	KQAYVR	K N G Q ⊕ ⊕ - ⊕	WVLLSG	
102	KQAYVR	K X G E ⊕ - - ⊖	WVLLSG	X = Cit
103	KQAYVR	K x G E ⊕ - - ⊖	WVLLSG	x = cit

Dabei sollte weitergehend auch der Einfluss des Ladungsmusters der Aminosäuren des β -turns auf die Sekundärstruktur hin untersucht werden. In Tabelle 6 sind die synthetisierten Sequenzen mit den jeweiligen Ladungsmustern zusammengefasst. Ein besonderes Interesse galt dem Foldon β -hairpin **102** mit L-Citrullin an der $i+1$ -Position des β -turns. In der vorangegangenen Arbeit von MATTHIAS KÖRLING in der Arbeitsgruppe GEYER konnte durch den Einbau von L-Citrullin in das Foldon-Miniprotein an dieser Position gezeigt werden, dass dies einen destabilisierenden Effekt auf die Tertiärstruktur und somit auch auf die Trimerisierung des Foldons hat. Daher sollte untersucht werden, ob dieser destabilisierende Effekt auch in dem isolierten Foldon β -hairpin auftritt und das Peptid **102** somit eine geringere Populierung der Sekundärstruktur aufweist. In diesem Fall könnte Peptid **102** einen näheren Aufschluss über die charakteristischen Faltungsparameter der Sekundärstruktur liefern und als negativ Referenz zur Bestimmung einer Faltungspopulation dienen. Weiterhin sollte auch der konformative Einfluss des α -Stereozyentrums von Citrullin an der $i+1$ -Position untersucht werden. Hierzu wurde das zum hairpin **102** diastereomere Peptid **103** mit D-Citrullin an dieser Position synthetisiert. Da bereits durch die Arbeiten von KÖRLING gezeigt werden konnte, dass durch die Einführung des bityklichen turn-Mimetikums Hot=Tap die Sekundärstruktur des isolierten Foldon β -hairpins im Vergleich zur nativen Sequenz stabilisiert werden kann, wurde dies ebenfalls in die hier zu untersuchende Foldon β -hairpin Sequenz inkorporiert (**98**). Zusätzlich wurde der Foldon β -hairpin **99** mit dem ebenfalls bityklichen turn-Mimetikum BTM synthetisiert. Hier sollten die Einflüsse der beiden turn-Mimetika auf die Fähigkeit hin die Sekundärstruktur des stark rechtsgängig verdrehten Foldon β -hairpins zu stabilisieren, verglichen werden.

Nach der Synthese und präparativen Aufreinigung der Peptide mittels RP-HPLC wurden diese mit Hilfe von 1D- und 2D-NMR-Experimenten vollständig charakterisiert. Durch die Auswertung der NOESY-NMR-Spektren konnte weiterhin die Ausbildung des β -hairpins anhand der long range NOE-Kontakte zwischen den Aminosäuren des hydrophoben clusters für alle dargestellten Peptide eindeutig nachgewiesen werden. Einen ersten Einblick in die strukturellen Unterschiede der synthetisierten Foldon β -hairpins **96-103** liefert bereits der Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (s. Abbildung 30). Dort weisen fast alle Peptide eine sehr hohe Signaldispersion im Amidischen Bereich auf. Besonders charakteristisch für β -hairpin Peptide ist die Hochfeldverschiebung der $i+3$ -Position des β -turns.^[210,211] Im Falle der Foldon β -hairpins ist im ^1H -NMR-Spektrum eine weitere Besonderheit zu erkennen. Die starke Tieffeldverschiebung der wasserstoffbrücken gebundenen Amidprotonen von Val¹⁴ und Val²¹, die sich auf der konvexen Seite des β -sheets befinden, sind ein klarer Indikator für die Ausbildung der Sekundärstruktur.^[208,212,213]

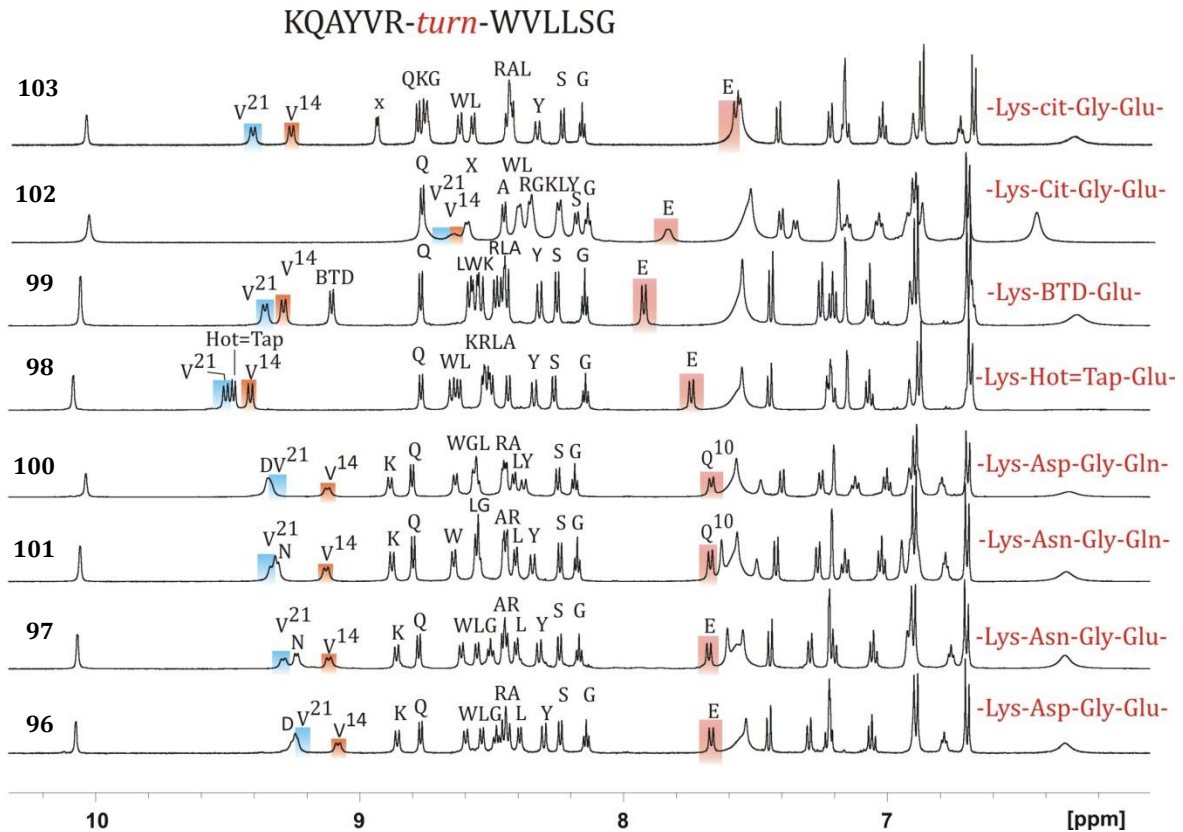


Abbildung 30: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0) im amidischen Bereich der synthetisierten Foldon β -hairpins **96-103**. Die charakteristische Hochfeldverschiebung der Wasserstoffbrückengebundenen $i+3$ Position des β -turns (rot hinterlegt) ist ein erstes Indiz für die Ausbildung einer Sekundärstruktur. Alle Peptide mit Ausnahme des L-Citrullin hairpins **102**, weisen eine hohe Dispersion, sowie die für die Foldon β -hairpins charakteristische Tieffeldverschiebung der Amidprotonen von Val¹⁴ und Val²¹ auf.

Um weitere Informationen über den Einfluss der *turn*-Mutationen auf die Stabilität der Sekundärstruktur der Foldon β -hairpins zu erhalten wurden die CSD-Werte der H_α -Protonen für die Peptide **96-101** bestimmt (Die Citrullin beinhaltenden Foldon β -hairpins **102** und **103** werden im Anschluss gesondert betrachtet). Diese ermöglichen einen ersten Vergleich der β -hairpins untereinander (s. Abbildung 31). Hier zeigt sich, dass wie zu erwarten der Foldon β -hairpin **98** mit dem *turn*-Mimetikum Hot=Tap die am stärksten ausgeprägten CSD-Werte aufweist. Das *turn*-Mimetikum BTD ist im direkten Vergleich zu Hot=Tap nur geringfügig schwächer populiert, womit die beiden hairpins **98** und **99** die am stärksten ausgeprägten Sekundärstrukturen in dieser Reihe der Foldon β -hairpins aufweisen. Insgesamt betrachtet bestätigt sich jedoch, dass die hairpins **96-101** nur sehr geringe Unterschiede in ihrer Stabilität aufweisen. Damit stehen die CSD-Werte im guten Einklang mit der Signaldispersion des amidischen Bereichs der ^1H -NMR-Spektren in Abbildung 30.

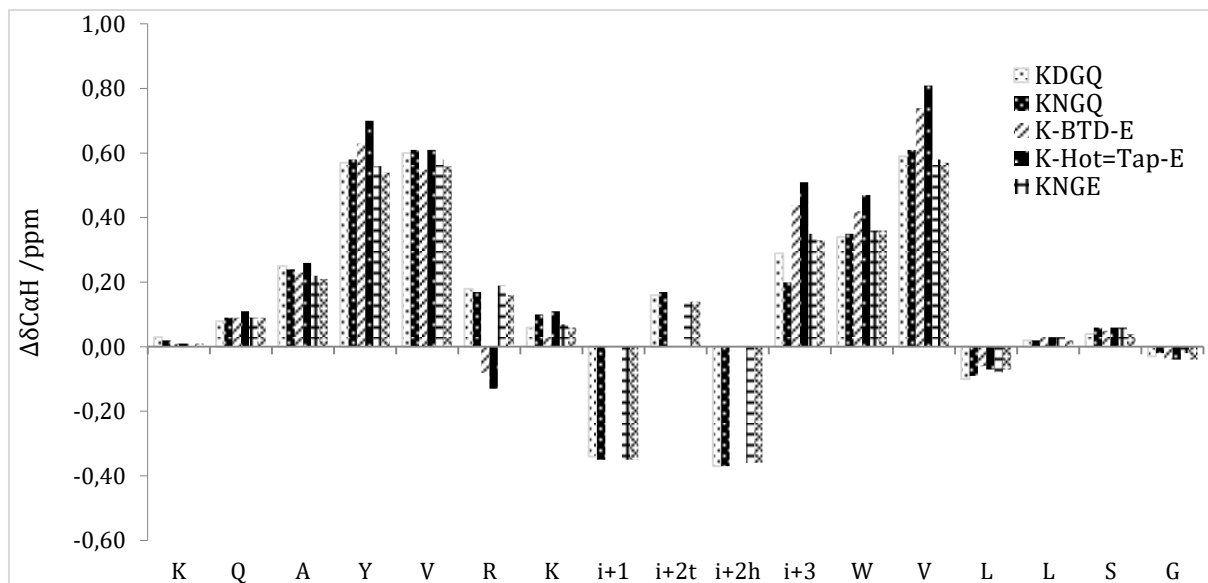


Abbildung 31: Vergleich der CSD-Werte der Foldon β -hairpins **97-101** mit einer hohen Dispersion im amidischen Bereich des ^1H -NMR-Spektrums. In der Legende sind die unterschiedlichen *turn*-Mutationen angegeben (vgl. Tab. 6).

Da im Falle des L-Citrullin *hairpins* **102** die Tieffeldverschiebung der Amidprotonen von Val¹⁴ und Val²¹ nur sehr schwach ausgeprägt ist und die chemischen Verschiebungen eher zu *random coil* Werten passen, kann bereits anhand des ^1H -NMR-Spektrums vermutet werden, dass auch im isolierten Foldon β -hairpin ein destabilisierender Effekt dieser Aminosäure auf die Sekundärstruktur ausgeübt wird. Überraschenderweise zeigt der diastereomere β -hairpin **103** mit D-Citrullin an der *i*+1-Position einen sehr hohen Dispersionswert im amidischen Bereich und extrem ausgeprägte Tieffeldverschiebung der Valin-Amidprotonen. Der Vergleich der CSD-Werte der diastereomeren *hairpins* **102** und **103** mit dem nativen Foldon β -hairpin **96** verdeutlicht den Einfluss

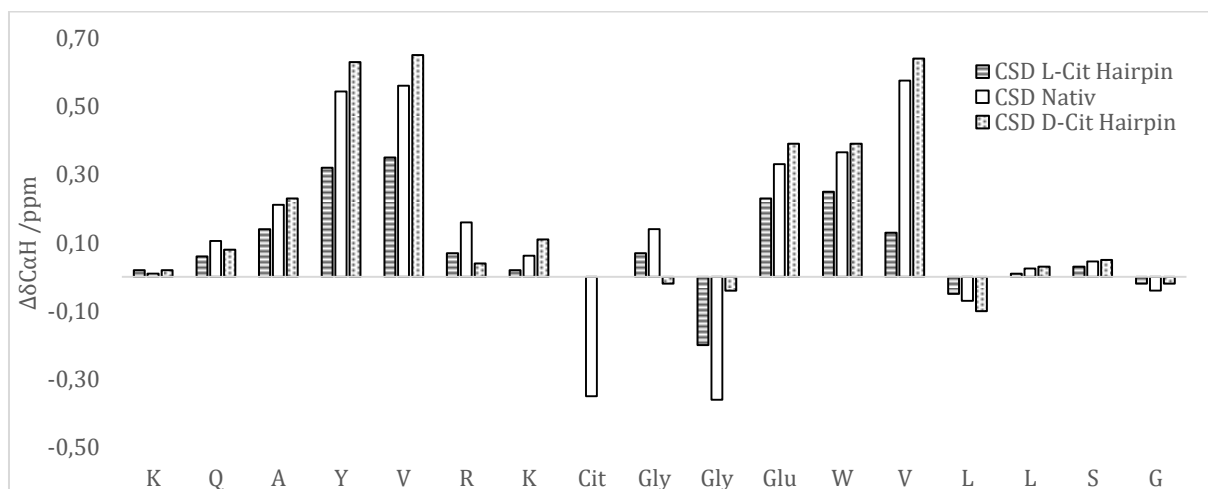


Abbildung 32: Vergleich der CSD-Werte zwischen den Diastereomeren des Citrullin β -hairpins **102** und **103** mit der nativen Sequenz des Foldon β -hairpins **96**.

der Stereokonfiguration des Citrullins auf die Ausbildung der Sekundärstruktur (s. Abbildung 32). Obwohl die Signaldisperison im ^1H -NMR-Spektrum des Peptides **102** sehr gering ist zeigen die CSD-Werte, dass eine geringe Populierung des β -hairpins vorhanden ist und somit eine reine *random coil* Struktur ausgeschlossen werden kann. Allerdings muss bei dieser Aussage generell berücksichtigt werden, dass die gefaltete Struktur eines β -hairpins immer in einem auf der NMR-Zeitskala schnellen Austausch mit der entfalteten *random coil* Struktur steht. Daher spiegelt der erhaltene Signalsatz der Resonanzsignale im NMR-Spektrum nur den populationsgewichteten Mittelwert einer Sekundärstruktur wieder.

Der Einfluss des Ladungsmusters der verschiedenen β -turns auf die Stabilität der Sekundärstruktur offenbarte sich erst bei der Vermessung der Peptide bei verschiedenen pH-Werten. Bei einem pH-Wert von drei weisen alle Peptide sehr ähnliche CSD-Werte auf und zeigen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Stabilität. Bei der Vermessung der Peptide bei einem pH-Wert von 7.4 konnte für die, die eine negative Ladung an der $i+1$ -Position des β -turns tragen (**96** und **100**), ein Rückgang im Betrag der CSD-Werte beobachtet werden. Dies deutet auf einen Verlust der Stabilität der Sekundärstruktur hin, der durch einen unterschiedlichen Protonierungsgrad der β -turns hervorgerufen wird hin. In Abbildung 33 ist dieser Effekt auf die CSD-Werte für den nativen Foldon β -hairpin **96** dargestellt.

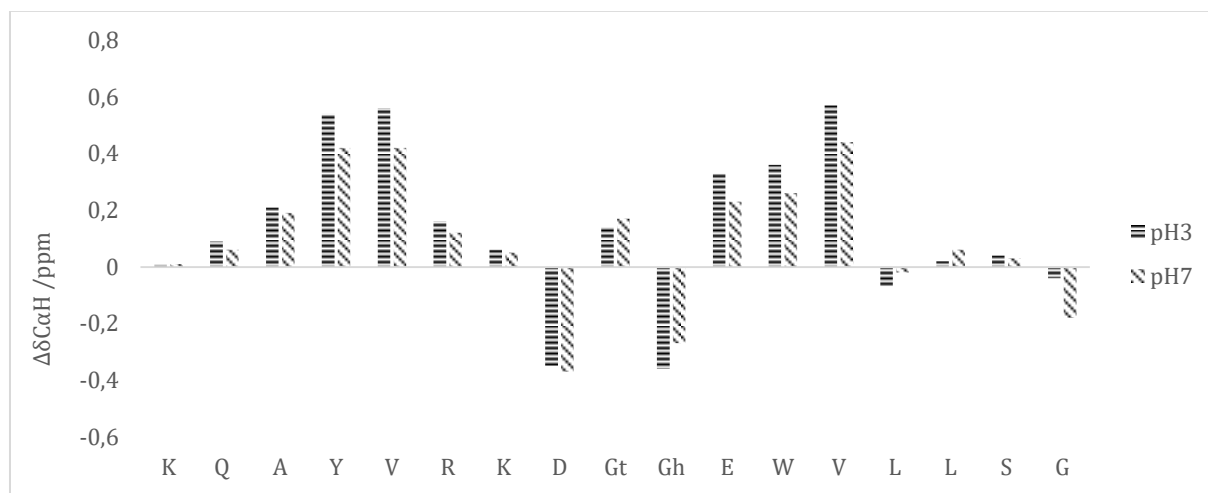


Abbildung 33: Vergleich der CSD-Werte des nativen Foldon β -hairpins **96** bei pH 3.0 und pH 7.4.

Alle anderen Foldon β -hairpins wiesen keine signifikante Abhängigkeit der CSD-Werte vom pH-Wert auf. Anhand der hier erhobenen Daten lässt sich bereits eine Aussage über die Konformation und den Einfluss der *turn*-Mutationen auf die Stabilität der Sekundärstruktur der synthetisierten Foldon β -hairpins machen. Allerdings lassen sie noch keine quantitative Aussage über den Faltungsgrad der Sekundärstruktur zu.

3.2.2 Bestimmung der Faltungspopulation der isolierten Foldon β -hairpins

3.2.2.1 Bereits bekannte Methoden zum Vergleich von β -hairpin Peptiden

Eine in der Literatur weit verbreitete Methode zur thermodynamischen Charakterisierung des Gleichgewichts zwischen gefaltet und ungefaltet, ist die Bestimmung von temperaturabhängigen Moleküleigenschaften wie der Absorption und Fluoreszenz mittels CD-Spektroskopie oder der Veränderung der chemischen Verschiebung in der NMR-Spektroskopie.^[214,215] Dabei werden die beobachteten Messgrößen gegen die Temperatur aufgetragen. Über diese Abhängigkeit kann eine „Protein-Schmelz-Kurve“ erstellt werden. Bei großen, globulären Proteinen zeigt eine solche Kurve einen sigmoidalen Verlauf, wohingegen kleine Peptide mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur aufgrund ihrer geringeren Anzahl von faltungsrelevanten Wechselwirkungen oft eine Verbreiterung bzw. Abflachung der Kurve aufweisen und der Schmelzpunkt hin zu geringeren Temperaturen verschoben ist.^[215] Als Resultat erreicht die Kurve für kleine Peptide in den meisten Fällen selbst bei niedrigen Temperaturen nie das „native Plateau“ (Maximum der Sigmoidfunktion), wodurch eine exakte Bestimmung der thermodynamischen Parameter (ΔG , ΔH , ΔS , T_s) nur schwer möglich ist. In diesem Zusammenhang hat sich als besonders akkurate Methode zur thermodynamischen Analyse die ^1H -NMR-Spektroskopie erwiesen, da die gemessenen Spektren im Vergleich zur CD-Spektroskopie keine Abhängigkeit zur Probenkonzentration aufweisen und sehr gut reproduzierbare Werte liefern.^[215,216] Als Grundlage der Bestimmung der thermodynamischen Stabilität von Peptiden mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur dient das zwei-Zustands-Modell (*two state modell*; gefaltet \rightleftharpoons ungefaltet), welches als Funktion der Temperatur (s. Gleichung 5) beschrieben werden kann.^[215]

$$\frac{dY}{d(1/T)} = -(Y_F - Y_U) \frac{K}{(K+1)^2} * \left(-\frac{\Delta H_m}{R} + \frac{\Delta C_P}{R} (T_m - T) \right) \quad (5)$$

Die struktureigenschaftsspezifischen Faltungsparameter wie charakteristische chemische Verschiebungen für den gefalteten Y_F und den ungefalteten Zustand Y_U in Gleichung 5 können in einem *two-state-modell* als konstant angesehen werden.^[215] Da die chemischen Verschiebungen der Protonen eines Peptides im ^1H -NMR-Spektrum mit Ausnahme der Amidprotonen (NH) sowohl im gefalteten als auch im ungefalteten Zustand nahezu keine Temperaturabhängigkeit aufweisen^[217], erfüllen sie die für Gleichung 5 Notwendige Konstanz der Faltungsparameter Y_F und Y_U .^[215] Durch die Messung von ^1H -NMR-Spektren bei steigender Temperatur zeigt sich besonders für H_α -Protonen als auch für aromatische und aliphatische Seitenketten, dass diese bei hohen Temperaturen einen Grenzwert erreichen. Diese Werte

korrelieren mit typischen *random coil* Werten.^[163,215,218] Durch die Auftragung der Ableitung erster Ordnung der chemischen Verschiebung ($d\delta$) gegen die Temperatur kann die somit die Schmelztemperatur auch von kleinen Peptiden bestimmt werden (s. Abbildung 34).

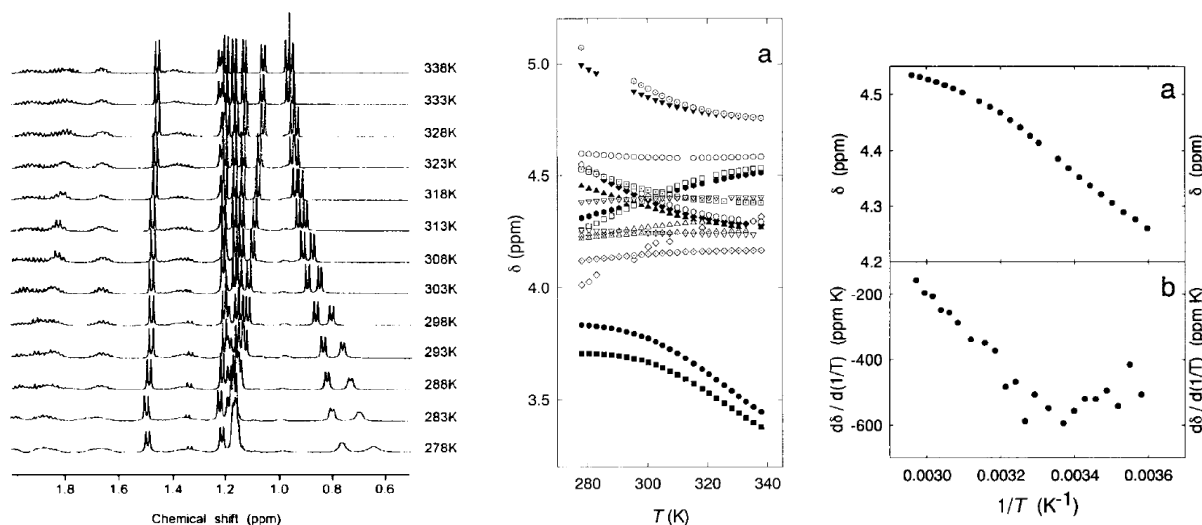


Abbildung 34: Beispiel zur thermodynamischen Charakterisierung eines β -hairpin-Peptides (G-Peptid) mittels ^1H -NMR-Spektroskopie von MUNETAKA *et al.* **links:** Vergleich der ^1H -NMR-Spektren im aliphatischen Bereich des G-Peptides. Bei steigender Temperatur erreichen die Signale einen konstanten Wert, der mit den typischen chemischen Verschiebungen von *random coil* Werten korreliert. **mittig:** Auftragung der chemischen Verschiebung der H_α -Protonen gegen die Temperatur. **rechts:** Auftragung der ersten Ableitung der chemischen Verschiebung gegen die Temperatur, ermöglicht die Bestimmung der Schmelztemperatur des β -hairpins in Lösung.^[209,215]

Diese Messungen sind auf Grund der langen Equilibrierungszeit für jede einzelne Temperatur jedoch extrem zeitaufwendig. Zwar kann auf diesem Weg eine absolute Aussage über thermodynamische Parameter wie der Schmelztemperatur oder der Änderung der Enthalpie gemacht werden und lässt auf diese Weise einen Vergleich der Peptide untereinander zu, jedoch wurde bisher keine Methode entwickelt um eine quantitative Aussage über die prozentuale Faltungspopulation treffen zu können.

Bevor eine weitere Diskussion über eine quantitative Aussage des Faltungsgrades einer Sekundärstruktur gemacht werden kann, muss zunächst die Frage nach einer Referenz für den Fall eines vollständig gefalteten und vollständig entfalteten Peptides geklärt werden. Diese Referenzen sind unabdingbar für einen Vergleich und eine Einordnung mit dem zu untersuchenden Peptid. Für Letzteres können genau wie bei der Bestimmung von CSD-Werten (vgl. Kapitel 1.4) die literaturbekannten *random coil* Werte von WISHART *et al.* oder WÜTHRICH *et al.* herangezogen werden.^[163,217,219] Diese Werte dienen für jede beliebige Peptidsequenz als 0%-Faltungsreferenz. Alternativ können durch die Synthese von Teilfragmenten des zu untersuchenden Peptides eigene, sequenzspezifische *random coil* Referenzen dargestellt werden. Die Frage nach einer 100%-Faltungsreferenz ist

dahingegen weitaus komplexer und kann nicht ohne Einschränkungen beantwortet werden. Fakt ist, die gezielte Synthese eines „gut faltenden“ Peptides ist durchaus möglich, aufgrund der Unvorhersagbarkeit einzelner Mutationen und der eingeschränkten Vergleichbarkeit der variierten Sequenzen untereinander, ist eine absolute 100%-Einordnung jedoch nicht möglich. Ziel ist es jedoch eine Rigidifizierung der Sekundärstruktur zu erreichen, die relativ zum nativen Peptid eine höhere Population aufweist und als 100%-Referenz gilt. Im Falle von β -hairpins kann dies durch die Einführung von *turn*-Mimetika wie dem bizyklischen Hot=Tap, BTD oder der Dipeptideinheit D-Pro-L-Pro erreicht werden.^[173,179,220–222] Weiterhin bietet die Makrozyklisierung eine interessante Möglichkeit um die Seitenkettenwechselwirkungen zwischen den β -Strängen, die maßgeblich zur Stabilisierung der Sekundärstruktur eines β -hairpins beitragen, zu erzwingen und somit die Struktur noch weiter zu stabilisieren. Eine erste Methode zur Bestimmung einer prozentualen Faltungspopulation für die Foldon β -hairpins auf Grundlage der NMR-Spektroskopie konnte von MATTHIAS KÖRLING in der Arbeitsgruppe GEYER basierend auf den Ergebnissen von ANDERSEN und WISHART *et al.* etabliert werden. Diese wird im Folgenden als MK-Methode abgekürzt. Diese basiert auf der Bestimmung von CSD-Werten, die in das Verhältnis zu einer selbst festgelegten 100%-Faltungsreferenz gesetzt werden. Hieraus ergibt sich Gleichung 6.^[212]

$$Population(\%) = \frac{\Delta\delta^1H}{\Delta\delta^1H_{100\%}} \quad (6)$$

Als 100%-Referenz diene dabei das Foldon β -hairpin Makrolactam *b*[KAYVRKΨEWVLL] (**104**), welches über die Seitenkette des *N*-terminalen Lysins mit dem *C*-Terminus verknüpft ist.^[212] Durch die Erstellung von Schmelzkurven (vgl. Abbildung 34) mittels temperaturabhängiger ¹H-NMR-Spektroskopie von vier verschiedenen Foldon β -hairpins konnte anhand der Signale mit nicht-linearer Temperaturabhängigkeit, die am Faltungsprozess beteiligten Aminosäuren identifiziert werden. Diese eigneten sich für eine relative Bestimmung der prozentualen Faltungspopulation. Die Auswahl der Faltungsparameter wurde dabei auf struktursensitive Protonen sowie die diastereotopen Protonen mit der größten diastereotopen Aufspaltung begrenzt. Daraus ergibt sich folgender Parametersatz zur Bestimmung der Faltungspopulation: Y¹³-3,5*H*, V¹⁴-NH, V¹⁴-H _{α} , R¹⁵-H _{β} , W²⁰-H _{α} , W²⁰-H _{β} , V²¹-NH, L²²-H _{α} , L²²-H _{β} , L²³-H _{δ} .^[212] Für jedes Proton wird dann im nächsten Schritt mit Hilfe von Gleichung 6 die jeweilige Population bestimmt und aus allen Werten der Durchschnitt gebildet. Dieser Durchschnittswert repräsentiert dann die Faltungspopulation des β -hairpins. Auf Grund dieser sehr spezifischen Faltungsparameter lässt sich die Methode ausschließlich auf Foldon β -hairpins anwenden, die sich nur in ihren *turn*-Sequenzen unterscheiden. Weiterhin ist eine vollständige Zuordnung aller

Protonen notwendig um die Berechnung Durchführen zu können. Bei Peptiden mit einer gering populierte Sekundärstruktur kann es sein, dass aufgrund von Signalüberlappungen im ^1H - sowie den 2D-NMR-Spektren eine vollständige Zuordnung nicht möglich ist (s. Abbildung 35).

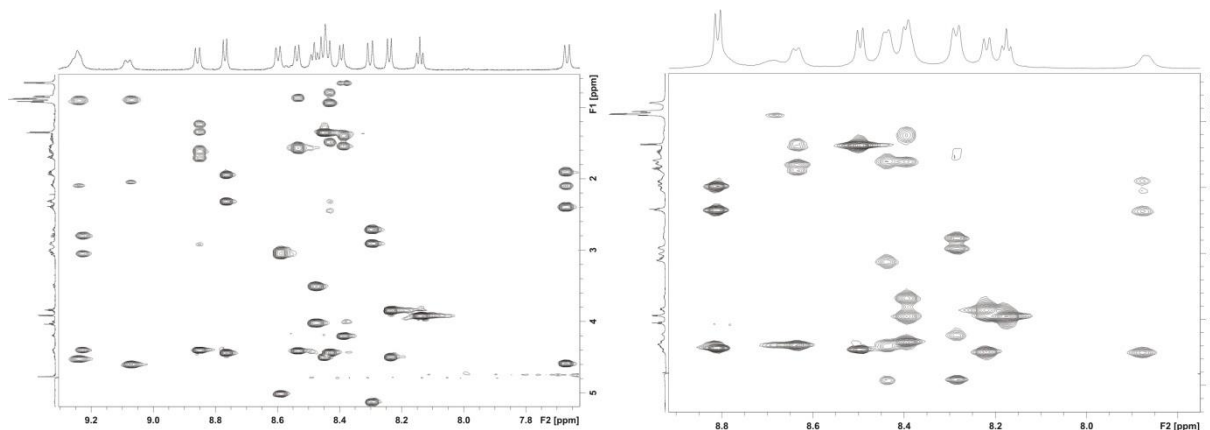


Abbildung 35: Durch die hohe Signaldispersion des nativen Foldon β -hairpins **96** (links) im amidischen Bereich des TOCSY-NMR-Spektrums (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0) ist eine vollständige Zuordnung der faltungsrelevanten Parameter für die Bestimmung der Faltungspopulation nach der MK-Methode möglich. Im Falle des L-Citrullin β -hairpins **102** (rechts) ist dies auf Grund der geringen Dispersion und Signalüberlappung nur sehr schwer möglich.

Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit eine Methode entwickelt werden, die es ermöglicht eine quantitative Aussage auch über den Faltungsgrad von gering populierte Sekundärstrukturen machen zu können und auf jede beliebige Sequenz angewandt werden kann. Einen Ansatz zur Lösung dieser Herausforderung lieferte hierfür eine zur Sekundärstrukturbestimmung von Proteinen angewandte Methode.

3.2.2.2 Bestimmung der Faltungspopulation über ACS-Werte

Bereits die frühen Arbeiten von WÜTHRICH *et al.* und später von WISHART *et al.* zur Bestimmung der *random coil* Referenzen konnten zeigen, dass insbesondere die chemischen Verschiebungen der H_α -Protonen der Aminosäuren eines Peptides oder Proteins ein sensibler Parameter für Sekundärstrukturen sind.^[159,163,217,219] Dabei weisen Protonen die sich innerhalb eines β -sheets befinden relativ zu den *random coil* Werten Verschiebungen weiter im Tieffeld und für α -helikale Strukturen weiter im Hochfeld auf.^[163,219] Jedoch muss dabei berücksichtigt werden, dass die Grenzen zwischen den Sekundärstrukturen fließend sind und es dadurch zu Überlappungen der charakteristischen Verschiebungen kommen kann. In Tabelle 7 sind die von WISHART *et al.* auf Grundlange von 100 Proteinen und Peptiden statistisch ausgewerteten

chemischen Verschiebungen für alle Aminosäuren innerhalb der typischen Sekundärstrukturen aufgelistet.^[163]

Tabelle 7: Chemische Referenzverschiebungen für Peptidrückgrate in Helix, β -sheet oder *random coil* Sekundärstruktur. Messbedingungen: pH = 5.0, 25 °C.^[163]

AS	δ^1H_α [ppm]			δ^1HN [ppm]		
	<i>sheet</i>	<i>coil</i>	<i>helix</i>	<i>sheet</i>	<i>coil</i>	<i>helix</i>
Ala	4.77	4.26	4.03	8.44	8.15	8.08
Cys (ox)	5.15	4.65	4.15	8.80	8.25	8.20
Cys (red)	5.15	4.65	4.15	8.80	8.25	8.20
Asp	4.94	4.60	4.43	8.51	8.36	8.18
Glu	4.78	4.28	4.01	8.53	8.37	8.22
Phe	5.09	4.54	4.16	8.75	8.17	8.18
Gly	4.20	3.96	3.81	8.34	8.33	8.29
His	5.06	4.53	4.33	8.62	8.21	8.10
Ile	4.68	4.15	3.67	8.68	7.98	8.02
Lys	4.69	4.26	3.99	8.48	8.23	7.99
Leu	4.82	4.36	4.00	8.60	8.08	8.05
Met	4.96	4.38	4.07	8.64	8.18	8.09
Asn	5.06	4.66	4.48	8.60	8.40	8.22
Pro	4.60	4.37	4.22	-	-	-
Gln	4.80	4.26	3.99	8.48	8.23	8.04
Arg	4.74	4.24	3.99	8.56	8.25	8.07
Ser	4.91	4.47	4.25	8.50	8.23	8.14
Thr	4.86	4.45	4.00	8.51	8.16	8.04
Val	4.60	4.12	3.58	8.62	8.04	8.02
Trp	5.19	4.55	4.38	8.59	7.92	8.12
Tyr	5.10	4.52	4.09	8.68	8.06	8.07

WISHART folgte bereits 1991, dass auch die Flexibilität einer Sekundärstruktur einen direkten Einfluss auf die chemischen Verschiebungen der H_α -Protonen hat. Er stellte die These auf, dass die Protonen von flexiblen β -Strängen oder α -Helices eine durchschnittliche chemische Verschiebung aufweist, die näher an den *random coil* Werten liegt als an den für die jeweilige Sekundärstruktur zu erwartenden Tieffeld- bzw. Hochfeldverschiebungen (s. Tabelle 7). In gleicher Weise müssen die Werte für rigide Sekundärstrukturen deutlich weiter entfernt von den *random coil* Werten liegen.^[159] Basierend auf dieser Aussage kann die Hypothese aufgestellt werden, dass die H_α -Verschiebungen einen direkten Rückschluss auf den Faltungsgrad einer Sekundärstruktur ermöglicht, da in diesen Fällen Flexibilität mit einer prozentualen

Faltungspopulation gleichgesetzt werden kann. Ein weiteres wichtiges Detail ist auch, das WISART von einer durchschnittlichen chemischen Verschiebung spricht. Interessanter Weise wird in der Bestimmung von Sekundärstrukturen von komplexen Proteinen mittels NMR-Spektroskopie tatsächlich auf eine empirische Methode zurückgegriffen, die sich die durchschnittliche chemische Verschiebung der $^1\text{H}_\alpha$ - oder ^1HN -Protonen dieser Strukturen zu nutze macht.^[163,223,224] Die von KRISHNAN *et al.* entwickelte ACS-Methode (*average chemical shift*) beruht auf der Korrelation zwischen den ACS-Werte eines bestimmten Nukleus des Proteinrückgrates mit dem prozentualen Inhalt der vorhandenen Sekundärstruktur der übergeordneten Tertiärstruktur eines Proteins. Die durchschnittliche chemische Verschiebung (ACS) der betrachteten Sekundärstrukturabschnitte i ist dabei über Gleichung 7 definiert. N ist definiert als die Anzahl der Kreuzsignale im NMR-Spektrum.^[224]

$$ACS_i = (1/N) \sum_{k=1,N} \delta_k \quad (7)$$

Durch die Korrelation zwischen den ACS-Werte für die $^1\text{H}_\alpha$ - und den ^1HN -Protonen kann eine Aussage über den prozentualen Anteil einer Sekundärstruktur an der gesamten Tertiärstruktur eines Proteins gemacht werden.^[163,224] Allerdings dient diese Methode ausschließlich der Identifizierung von Sekundärstrukturen und nicht der Bestimmung und Quantifizierung einer Faltungspopulation dieser. Selbes trifft auch auf die alternativ zur ACS-Methode existierende Variante zur Identifizierung von Sekundärstrukturen über den CSI (*chemical shift index*) zu.^[163,223,225,226] Auf diese soll an dieser Stelle jedoch nicht weiter eingegangen werden.

Dennoch stellt sich die Frage, wenn eine akkurate Identifizierung anhand der ACS-Werte der struktursensitiven H_α -Protonen möglich ist, ob dieser Wert ebenfalls eine Herleitung eines prozentualen Faltungsgrades ermöglicht. Daher wurde in Anlehnung zu der Bestimmung von Sekundärstrukturen von Proteinen über die ACS-Werte auch für die Foldon *β -hairpins* **96-104** der jeweilige ACS-Wert bestimmt. Dabei muss berücksichtigt werden, dass ein *β -hairpin* streng genommen in zwei Sekundärstrukturen unterteilt werden kann: das *β -sheet* und den *β -turn*, der die beiden einzelnen *β -Stränge* des antiparallelen *sheets* miteinander verknüpft. Da die Aminosäuren, die an der Ausbildung des *β -turns* beteiligt sind, sich im Falle der $i+3$ -Position in der geometrischen Umgebung einer 3_{10} -Helix befinden und die $i+1$ - sowie $i+2$ -Position weder eine gestreckte noch helikale Konformation einnehmen, weisen die chemischen Verschiebungen insgesamt betrachtet keine charakteristischen Merkmale für ein einheitliches Sekundärstrukturmotiv auf.^[112,227] Damit die ACS-Werte nur Strukturinformationen über das *β -sheet* enthalten, wurden die chemischen Verschiebungen der Aminosäure von der i - bis

$i+3$ -Position bei der Berechnung nicht berücksichtigt (s. Gl. 8). Als besonders interessant stellte sich die Korrelation zwischen der durchschnittlichen Verschiebung der am β -sheet beteiligten $^1\text{H}_\alpha$ -Protonen der isolierten Foldon β -hairpins und der Faltungspopulation heraus, die über die zuvor beschriebene MK-Methode bestimmten wurden (s. Abbildung 36).

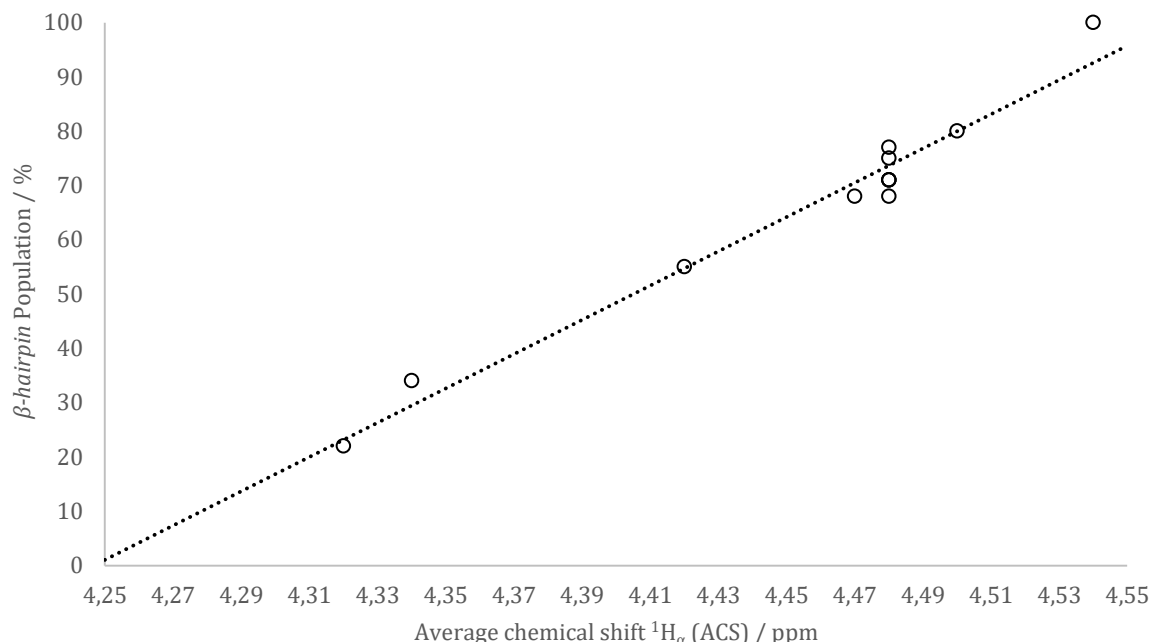


Abbildung 36: Auftragung der durchschnittlichen chemischen Verschiebung der am β -sheet beteiligten $^1\text{H}_\alpha$ -Protonen (ACS, average chemical shift) für die Foldon β -hairpins **96-104** sowie **121, 125** und **129** (s. Kap. 3.3) in Abhängigkeit der Faltungspopulation, die nach der MK-Methode bestimmt wurde.

Durch den linearen Zusammenhang zwischen den ACS-Werten des β -sheets der Foldon hairpins und der davon unabhängig bestimmten Faltungspopulationen kann eine einfache mathematische Beziehung hergeleitet werden, die es erlaubt nur anhand der durchschnittlichen chemischen Verschiebungen der $^1\text{H}_\alpha$ -Protonen eines Peptides den prozentualen Faltungsgrad einer Sekundärstruktur zu bestimmen. Im Folgenden wird geklärt, wie dies auf der Basis der ACS-Werte von β -hairpin Peptiden erreicht werden kann.

Bestimmung der relativen Faltungspopulation (FP) von β -hairpins über ACS-Werte

Die hier entwickelte Methode dient zum relativen Vergleich von β -hairpins zueinander, die sich nur in ihrem *turn* unterscheiden oder durch Einzelmutationen im *sheet*. Sind mehrere Peptide vorhanden, wird von allen mit Hilfe von Gleichung 8 der ACS-Wert (*average chemical shift*) der $^1\text{H}_\alpha$ -Protonen bestimmt. Bei der Berechnung werden die *turn*-Aminosäuren (AS) von i bis $i+3$ nicht berücksichtigt, da diese sich in einer helikalen Umgebung befinden und somit nicht zur Faltungspopulation des β -sheets beitragen.

$$ACS = \frac{\sum \delta H_\alpha \text{ aller AS} - \sum \delta \text{ turn AS}}{\sum \text{AS im Peptid} - \sum \text{turn AS}} \quad (8)$$

Beispiel anhand des nativen Foldon β -hairpins 96:

						i	$i+1$	$i+2$	$i+3$							
	K	Q	A	Y	V	R	K	D	G	E	W	V	L	L	S	G
H_α	4.04	4.44	4.50	5.12	4.60	4.43	4.40	4.39	3.76	4.58	5.01	4.52	4.20	4.40	4.49	3.92

$$ACS = (4.04+4.44+4.50+5.12+4.60+4.43+5.01+4.52+4.20+4.40+4.49+3.92)/12 = 4.47$$

Das Peptid mit dem höchsten ACS-Wert dient als Referenz mit einem Faltungsgrad von 100% und alle anderen Faltungspopulationen werden relativ zu diesem bestimmt. Daher ist eine gezielte Synthese eines rigiden Peptides, das als 100%-Faltungsreferenz dient nicht notwendig. Weiterhin ist für die Berechnung der Faltungspopulation mindestens eine *random coil* Referenz notwendig, die das untere Limit mit 0% darstellt. Hierzu können die *random coil* Werte von WISHART *et al.* aus Tabelle 7 herangezogen werden.^[163] Alternativ können zwei Peptide, die sich durch den gedanklichen Schnitt zwischen der $i+1$ - und $i+2$ -Position des zu untersuchenden *hairpins* ergeben würde, oder mehrere Fragmente der β -Stränge als *random coil* Referenz dienen. Auch von diesen Peptiden wird der ACS-Wert bestimmt, der dann die 0% Referenz darstellt. Die $ACS_{0\%}$ -Referenz wird genau wie die anderen ACS-Werte der zu bestimmenden Peptide über Gleichung 8 berechnet. Durch den linearen Zusammenhang zwischen der Faltungspopulation und dem ACS-Wert ergibt sich Gleichung 9, die zur Berechnung der prozentualen Faltungspopulation (FP) dient:

$$FP = \frac{100}{ACS_{100\%ref.} - ACS_{0\%ref.}} * (ACS - ACS_{0\%ref.}) \quad (9)$$

Durch einsetzen der zuvor Bestimmten ACS-Werte in Gleichung 9 mit dem *random coil* Wert für die Sequenz des Foldon β -hairpins, der mit Hilfe von Tabelle 7 berechnet wurde, ergeben sich die in Tabelle 8 Zusammengefassten Faltungspopulationen. Um eine Aussage über die Gültigkeit der hier entwickelten ACS-Methode treffen zu können wurde die berechneten Faltungspopulationen mit denen der MK-Methode verglichen.

Tabelle 8: Zusammenfassung der Faltungspopulationen beider Methoden und der berechneten ACS-Werte für die synthetisierten Foldon β -hairpins **96-103** (KQAYVR-*turn*-EWVLLSG) und dem makrozyklischen hairpin **104** b[KAYVRK Ψ EWVLL]^[212] der in der MK-Methode als 100% Referenz dient.

Nr.	<i>turn</i> $i \rightarrow i+3$	ACS	FP [%] über ACS	FP [%] nach MK	Abweichung [%]
104	b[--K-Hot=Tap-E--]	4.54	100	100	0
98	-K-Hot=Tap-E-	4.50	84	80	4
99	-K-BTD-E-	4.48	76	77	1
103	-K-x-G-E-	4.48	76	75	1
101	-K-N-G-Q-	4.48	76	71	5
100	-K-D-G-Q- (pH3)	4.48	76	71	5
100	-K-D-G-Q- (pH7)	4.44	60	57	3
97	-K-N-G-E-	4.48	76	68	8
96	-K-D-G-E- (pH3)	4.47	72	68	4
96	-K-D-G-E- (pH7)	4.42	52	48	4
102	-K-X-G-E-	4.37	35	n/a	n/a
<i>random coil</i> ^[163]		4.29	0	0	0

Da beide Methoden auf unterschiedliche Parameter zur Bewertung der Faltungspopulation zurückgreifen und somit gänzlich unabhängig voneinander sind, ist es umso bemerkenswerter, dass die durchschnittliche Abweichung zwischen den berechneten Faltungspopulationen bei nur 3.5% liegt. Damit ist der Beweis erbracht, dass die ACS-Methode, die nur auf der chemischen Verschiebung der $^1\text{H}_\alpha$ -Protonen beruht eine ähnlich präzise Aussage über den Faltungsgrad des Foldon β -hairpins zulässt wie die MK-Methode. Dies ist beeindruckend, da im Falle der MK-Methode für den Foldon β -hairpin extrem spezifische und faltungssensitive Parameter wie die chemische Verschiebung der β -Protonen von R¹⁵ und W²⁰ sowie die diastereotope Aufspaltung der L²² und L²³ δ -Protonen berücksichtigt wurden.

Somit konnte gezeigt werden, dass die chemische Verschiebung der H_α -Protonen von Aminosäuren innerhalb eines Peptides nicht nur eine extrem sensitive Parameter für die Sekundärstruktur selbst, sondern darüber hinaus auch für den Faltungsgrad dieser darstellen. Durch die Bestimmung des ACS-Wertes werden außerdem Ausreißer bei den chemischen

Verschiebungen nach oben oder unten, die durch einen lokalen konformativen Einfluss oder durch Solvenseffekte auftreten können, kompensiert. Die hier entwickelte Methode ist somit allgemein gültig und kann zum relativen Vergleich auf jeden beliebigen β -hairpin angewandt werden. Auch der zuvor beobachtete Einfluss des pH-Wertes auf die CSD-Werte (vgl. Abbildung 33) kann mit Hilfe der ACS-Methode quantifiziert werden. So zeigt sich, dass besonders der β -turn des nativen Foldon β -hairpins **96** bei einer Erhöhung des pH-Wertes von drei auf sieben, sensitiv auf die Veränderung der äußeren Umgebung reagiert, was in einen Verlust der Faltungspopulation von 20% widergespiegelt wird.

Ein weiterer großer Vorteil der ACS-Methode gegenüber anderen Methoden zur Quantifizierung des Faltungsgrades oder dem Vergleich von Sekundärstrukturen liegt in der einfachen Durchführbarkeit und Reproduzierbarkeit. So ist keine vollständige Zuordnung aller Protonen eines Peptides notwendig und bereits aus der Kombination eines TOCSY- und NOESY-NMR-Spektrums kann die Faltungspopulation nach der Sequenzierung mittels „sequential walk“ über die H_α -Protonen für jeden beliebigen β -hairpin bestimmt werden. Dies verringert vor allem die Messzeit und auch den Zeitaufwand generell enorm. Außerdem ist die Methode leicht nachzuvollziehen und die notwendigen Messungen können an jedem NMR-Gerät durchgeführt werden. Besonders interessant ist diese Methode für hairpins mit einer schwach ausgeprägten Vorzugskonformation, die eine starke Signalüberlappung oder Signalverbreiterung im NMR-Spektrum aufweisen, wie im Falle des L-Citrullin Foldon β -hairpins **102**. Da nur die chemischen Verschiebungen der H_α -Protonen des β -sheet benötigt werden, lässt sich auch für gering populierte β -hairpins eine Faltungspopulation bestimmen.

Da anhand der ACS-Werte nicht nur β -sheets sondern auch helikale Strukturen identifiziert werden können, kann die hier entwickelte ACS-Methode auch auf dieses Sekundärstrukturmotiv erweitert werden. Das Verfahren bleibt identisch, jedoch muss berücksichtigt werden, dass der random coil Wert bei helikalen Strukturen der höchste Wert ist, da die chemischen Verschiebungen der Helices im Vergleich zum random coil Wert weiter im Hochfeld liegen. Die Bestimmung von Faltungspopulationen für α -Helices wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt. Das Flussdiagramm im Anhang dieser Arbeit bietet jedoch eine Anleitung zur Bestimmung der Faltungspopulation jeglicher Sekundärstruktur. Allerdings wurde die Anwendbarkeit der ACS-Methode auf komplexere β -Faltblattstrukturen untersucht. Diese Ergebnisse werden im Folgenden Kapitel anhand der Pin1 WW-Domäne diskutiert.

3.2.3 Anwendung auf komplexere Systeme

Um die Anwendbarkeit der entwickelten Methode zur allgemein gültigen Bestimmung der Faltungspopulation auch in komplexeren Miniproteinen untersuchen zu können, wurden zwei Derivate der Pin1 WW-Domäne synthetisiert sowie NMR-Daten von bereits in der Literatur beschriebenen WW-Domänen des humanen Pin1 Proteins (hPin1) ausgewertet und verglichen.

3.2.3.1 Pin1 WW-Domäne

Die Zellzyklus regulierende hPin1 Prolin-*cis/trans*-isomerase ist ein Protein, bestehend aus zwei Domänen. Bei der Übernahme seiner physiologischen Rolle, bindet die *N*-terminale WW-Domäne an prolinreiche Liganden, die als Erkennungsmarker vorangestellt zum Prolin (P) einen Phosphoseryl- oder Phosphotreoninyl-Rest (S^P/T^P) tragen. Die *C*-terminale Domäne, die PPlase, katalysiert dann die *cis-trans*-Isomerisierung zwischen der S^P -P- bzw. T^P -P-Amidbindung (s. Abbildung 37).^[228]

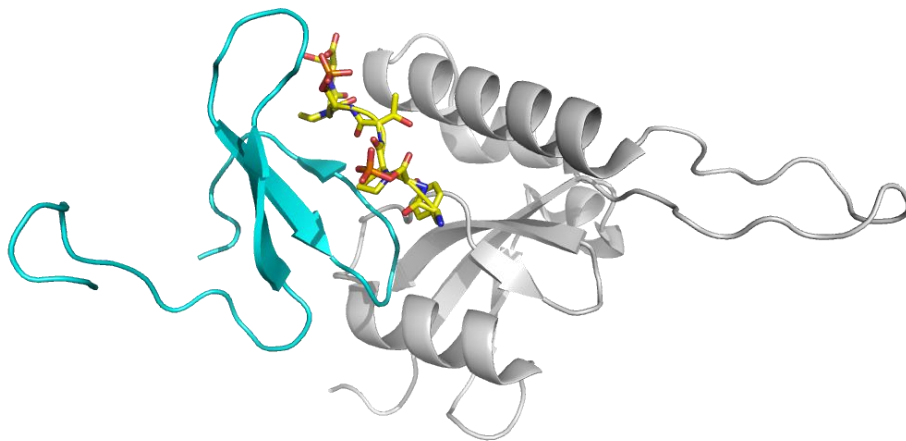


Abbildung 37: Darstellung der Kristallstruktur von hPin1 (PDB-Code: 1F8A). Die WW-Domäne (türkis) befindet sich im Komplex mit der Peptidyl-Prolyl-*cis/trans*-Isomerase (PPlase, grau) sowie einem Hexapeptid mit der Erkennungsmarker tragenden Sequenz YS^PPTS^P (gelb) als Liganden.

Die generelle Struktur aller WW-Domänen zeichnet sich durch ein dreisträngiges β -Faltblattmotiv aus und wurden bereits ausgiebig im Rahmen von Studien zur Proteinfaltung untersucht, da sie thermisch reversibel entfalten werden können und eine hohe Kooperativität während der Faltung nach dem *two-state* Modell aufweisen.^[229–231] Der Wild-Typ der Pin1 WW-Domäne gehört zu den kleinsten bekannten, isoliert vorkommenden β -Faltblättern und besitzt einen β -bulge-turn mit sechs Aminosäuren (SRSSGR) innerhalb dieses turns, der auch

als *loop 1* bezeichnet wird und durch den Arginin-Rest an der *i*+5-Position wesentlich zur Liganden-Bindungsenergie durch die Erkennung von phosphorylierten Serylresten beiträgt. Im Vergleich dazu besitzt ein klassischer β -turn nur vier Aminosäuren. Die Kristallstrukturanalyse des hPin1-Proteins offenbart zusätzlich, dass *loop 1* eine ungewöhnliche Konformation, bestehend aus einem β II'-turn mit vier Aminosäuren einnimmt, der in den insgesamt sechs Aminosäuren beinhaltenden *loop* eingebettet ist.^[228] KELLY *et al.* konnten zeigen, dass durch Mutationen im Bereich des intrinsisch flexiblen *loop 1* der Pin1 WW-Domäne die Struktur nicht wesentlich beeinflusst wird und auch der Austausch eines *bulge-turns* (5 AS, typisch für andere WW-Domänen) oder des β -*bulge-turns* (6 AS) gegen einen β I'-oder β II'-turn (4 AS) möglich ist. Die Aminosäuren, die den mittleren Strang des β -Faltblatts mit dem dritten Strang verbinden, bilden einen π -*loop*, bestehend aus vier Aminosäuren (HITN), der auch als *loop 2* bezeichnet wird. Weiterhin kann der N-Terminus der WW-Domäne um neun Aminosäuren ohne den Verlust der Sekundärstruktur verkürzt werden.^[221,228,232,233] Diese verkürzten WW-Domänen stellen ein gutes Modell für ein in Lösung stabiles, nicht über Disulfidbrücken stabilisiertes antiparalleles β -Faltblatt dar. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden zwei Derivate (**105** und **106**) der auf 31 Aminosäuren reduzierten Pin1 WW-Domäne zur Untersuchung des Faltungsgrades synthetisiert (s. Tabelle 9). Neben der Analyse der Faltungspopulationen sollte außerdem untersucht werden, ob das in der Arbeitsgruppe GEYER entwickelte β -turn Mimetikum Hot=Tap erfolgreich einen β II'-turn innerhalb des *loop 1* der Pin1 WW-Domäne stabilisieren kann. Die zweite Mutante der Pin1 WW-Domäne sollte ebenfalls einen β -turn mit der zentralen Asp-Gly-Dipeptideinheit an der *i*+1 und *i*+2-Position des Foldon *hairpins* tragen und mit existierenden *turn*-Mutationen der Literatur bezüglich seiner Stabilität verglichen werden.

Tabelle 9: Vergleich der synthetisierten Sequenzen mit der nativen, sowie den Literatursequenzen. Die Nummerierung der Aminosäurereste bezieht sich im Folgenden auf die beiden synthetisierten Mutanten **105** und **106** beginnend bei Lysin. Das β -Faltblatt wird dabei von den Aminosäuren W⁶→R⁹, V¹⁵→F¹⁸ und A²⁴→E²⁸ gebildet.

Peptid	N-Term	turn	C-Term	
107	GSHGMADEEKLPPGWEKRM	SRSSGR	VYYFNHITNASQWERPS	nativ
108	KLPPGWEKRM	SRSSGR	VYYFNHITNASQWERPS	KELLY <i>et al.</i> ^[230]
109	KLPPGWEKRM	FRSNGT	VYYFNHITNASQFERPS	KELLY <i>et al.</i> ^[234]
110	KLPPGWEKRM	FANGT	VYYFNHITNASQFERPS	KELLY <i>et al.</i> ^[234]
105	KLPPGWEKRM	S _{Hot=Tap} R	VYYFNHITNASQFERPS	
106	KLPPGWEKRM	SDGR	VYYFNHITNASQFERPS	

Die Synthese der Pin1 WW-Domänen **105** und **106** erfolgte in einem 0.1 mM Ansatz mit Hilfe des mikrowellenunterstützten Peptidsynthesizers LIBERTY BLUE (CEM) unter Standardbedingungen

auf ein mit Serin vorbeladenes 2-CTC-Harz. Nach Abspalten vom Trägerharz wurden die Rohpeptide mittels präprativer RP-HPLC aufgereinigt und NMR-Spektroskopisch untersucht. Beide Peptide konnten in hoher Reinheit und mit guten Ausbeuten erhalten werden. Der Vergleich der ^1H -NMR-Spektren der beiden synthetisierten Peptide offenbart im Hochfeld eine Besonderheit der Tertiärstruktur der amphiphilen WW-Domänen (s. Abbildung 38). Der für die Bindung der prolinreichen Liganden verantwortliche hydrophobe *cluster* auf der konvexen Seite der WW-Domäne, der durch eine Aneinanderreihung von hydrophoben Wechselwirkungen auf der *N*-terminalen Seite des β -Faltblattes durch die Aminosäuren L², W⁸, Y¹⁷, N¹⁹ und P³⁰ (*hydrophobic core 1*) gebildet wird und durch den sogenannten „proline buckle“ in seiner Konformation fixiert wird, manifestiert sich bei einem Teil der beteiligten Aminosäuren in ungewöhnlichen chemischen Verschiebungen. Weiterhin spielt die Interaktion der Aminosäuren Pro³ und Pro³⁰ die den „proline buckle“ zusammen mit Trp⁶ durch hydrophobe Wechselwirkungen bilden, eine wichtige Rolle um *N*- und *C*-Terminus der Domäne zusammen zu halten und die Tertiärstruktur zu stabilisieren.^{[233][235]}

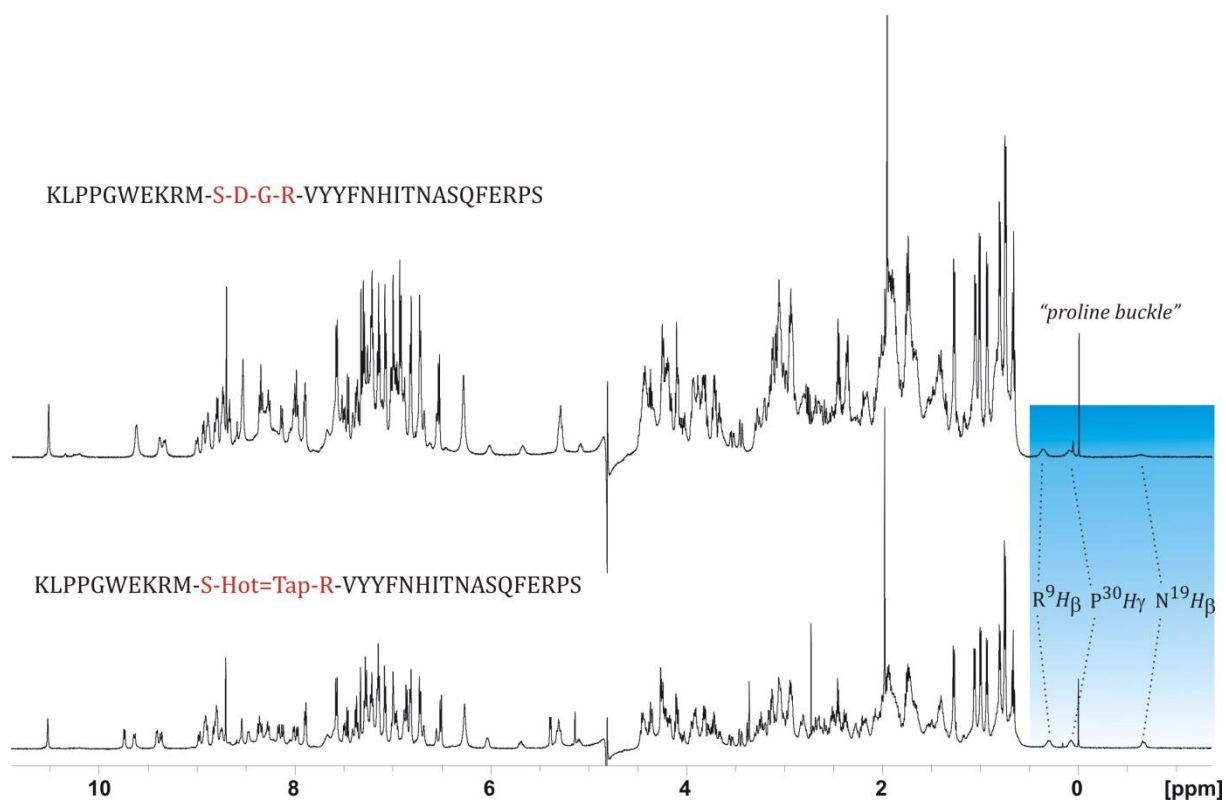


Abbildung 38: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/D₂O (11:1), pH = 3.0) der WW-Domäne mit dem Dipeptidmimetikum Hot=Tap innerhalb des $\beta\text{II}'$ -turns (unten) sowie der WW-Domäne mit der Dipeptideinheit Asp-Gly an der *i*+1 und *i*+2-Position des β -turns (oben). In beiden Spektren ist deutlich die für die WW-Domänen typische Hochfeldverschiebung der β -Protonen der Aminosäuren R⁹; N¹⁹ sowie der γ -Protonen von Pro³⁰ zu erkennen (blau hinterlegt), die ein starker Indikator für die Ausbildung des β -Faltblattes sind. Auch die große Signaldispersion im amidischen Bereich zwischen 2.47 ppm (**106**; DG-turn) und 2.60 ppm (**105**; Hot=Tap-turn) lässt auf eine Ausbildung der Tertiärstruktur schließen.

Durch die starken hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb des „*hydrophobic core 1*“ und dem „*proline buckle*“ kommt es bei P³⁰ durch die Wechselwirkungen mit W⁸ zu einer starken Abschirmung der γ -Protonen die eine Hochfeldverschiebung der Resonanzsignale um Werte von 0.00 ppm zur Folge hat. Weiterhin sind die β -Protonen von R⁹ durch die Nachbarschaft zu W⁸ stark abgeschirmt und weisen dadurch chemische Verschiebungen von >0.40 ppm auf. Besonders markant ist dieser Effekt jedoch bei den β -Protonen von N¹⁹ die mit einer chemischen Verschiebung von > -0.50 ppm ein starker Indikator für die Ausbildung der Tertiärstruktur der WW-Domäne ist.^[230] Wie in Abbildung 38 zu erkennen ist, weisen beide synthetisierten Peptide **105** und **106** neben diesen typischen Merkmale der Proteinfaltung der WW-Domänen im Hochfeld des ¹H-NMR-Spektrums auch eine starke Signaldispersion im amidischen Bereich auf. Durch diese hohe Dispersion ist es möglich mit Hilfe von TOCSY- und NOESY-NMR-Spektren eine vollständige Sequenzierung des Proteins durchzuführen und alle Protonen zuzuordnen (vgl. Abbildung 39).

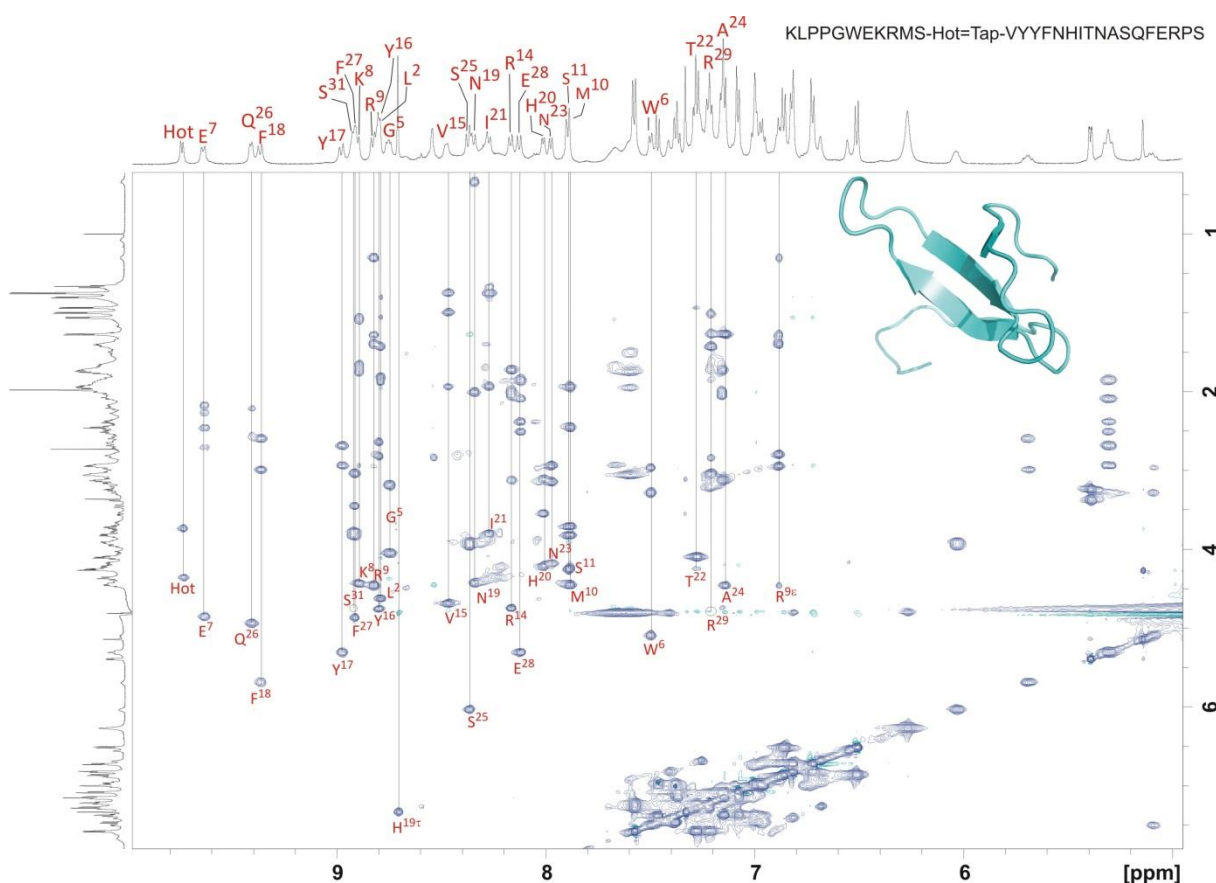


Abbildung 39: Darstellung des Amidischen Bereichs des TOCSY-NMR-Spektrums (600 MHz, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/D₂O (11:1), pH = 3.0) der WW-Domäne **105** mit dem Dipeptidmimetikum Hot=Tap innerhalb des β II'-turns an der $i+1$ und $i+2$ -Position. Auf Grund der hohen Signaldispersion von 2.60 ppm im Amidischen Bereich des Spektrums ist eine Vollständige Zuordnung aller Protonen des Proteins möglich.

Durch die erfolgreiche Sequenzierung und Zuordnung aller α -Protonen der synthetisierten WW-Domänen ist es möglich einen ersten strukturellen Vergleich mit den literaturbekannten Domänen machen zu können und die Zuordnung auf ihre Richtigkeit hin zu überprüfen. Hierzu wurde zunächst die CSD-Werte der synthetisierten WW-Domänen **105** und **106** mit den *bulge-turn* Domänen **108** und **109** von KELLY *et al.* miteinander verglichen (s. Abb. 40 und 41).

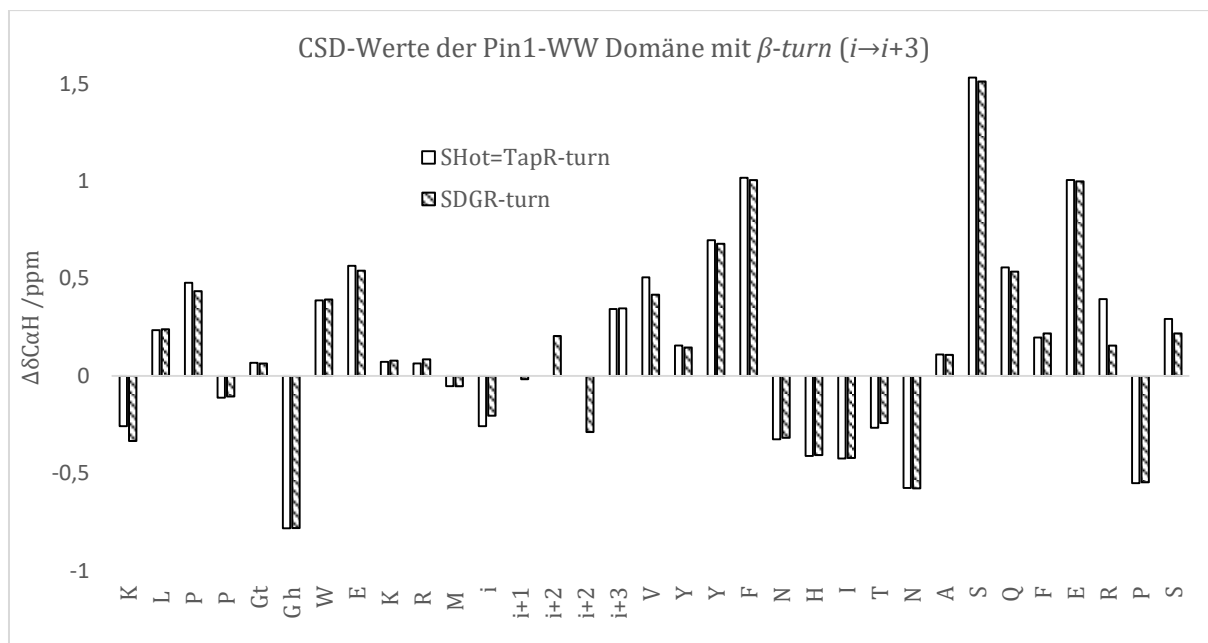


Abbildung 40: Vergleich der CSD-Werte der synthetisierten Pin1-WW-Domänen **105** und **106** mit einem β -turn.

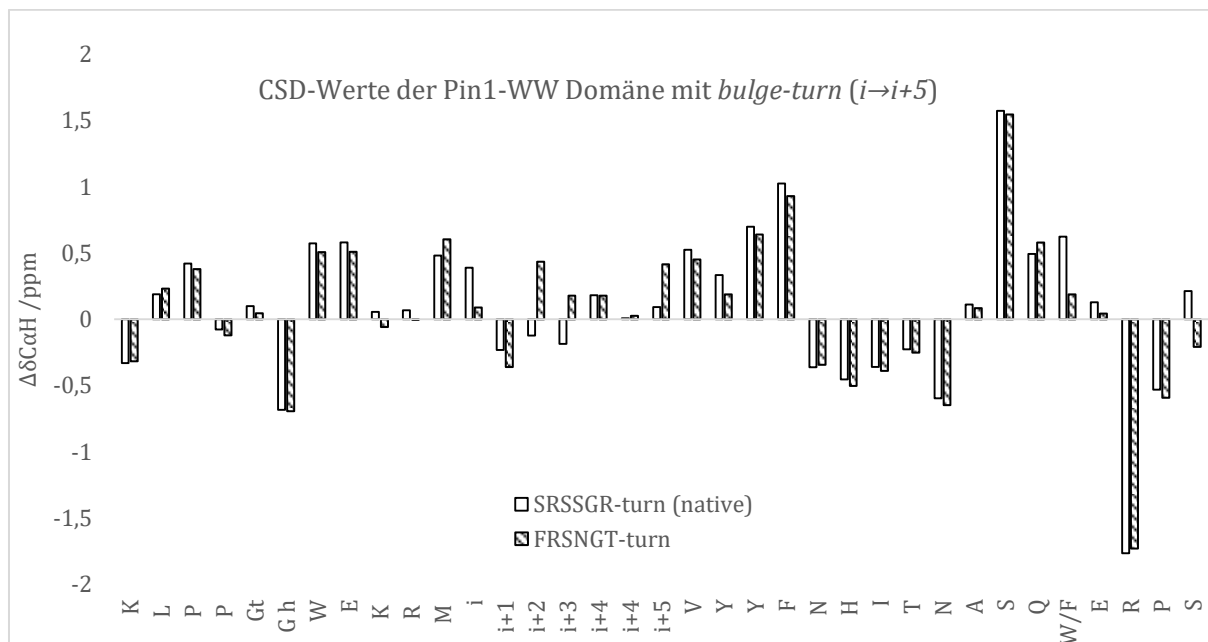


Abbildung 41: Vergleich der CSD-Werte der Literaturbekannten Pin1-WW-Domänen **108** und **109** mit einem *bulge-turn*.^[230,234]

Der erste Vergleich der Domänen belegt, dass die synthetisierten Peptide **105** und **106** nahezu identische Werte zu den Literaturbekannten WW-Domänen **108** und **109** für die CSD-Werte der α -Protonen aufweisen. Weiterhin weisen sie die charakteristischen positiven Werte im Bereich der β -Stränge auf, die ein Indikator für eine wohl definierte β -Faltblattstruktur und somit einer nativen Faltung der WW-Domänen Tertiärstruktur sind. Außerdem ist zu erkennen, dass das β -sheet $\beta 2$ bestehend aus Strang 2 (V¹⁵-F¹⁸) und Strang 3 (A²⁴-E²⁸), die über den π -loop miteinander verknüpft sind, eine deutlich stärker ausgeprägte Struktur im Vergleich zum β -sheet $\beta 1$ bestehend aus Strang 1 (W⁶-R⁹) und Strang 2 aufweist. Letztendlich weisen beide synthetisierten WW-Domänen ein sehr konsistentes Muster im Bereich der H α -CSD-Werte im Vergleich zu den literaturbekannten WW-Domänen auf. Die CSD-Daten stehen auch im Einklang mit den im ¹H-NMR-Spektrum beobachteten Faltungsindikatoren des „proline buckle“ und der hohen Dispersion im amidischen Bereich. Damit zeigt diese erste Analyse, dass sowohl das β -turn Mimetikum Hot=Tap als auch die zentrale Asp-Gly Dipeptideinheit des Folons erfolgreich innerhalb eines β -turns an der Stelle des loop 1 der Pin1 WW-Domänen eingebaut werden können und die native Faltung nicht negativ beeinträchtigen. Der einzige signifikante Unterschied zwischen den bulge-turn WW-Domänen und den β -turn Domänen ist bei R²⁹ zu finden (vgl. Abbildung 40 und 41). Dieser Rest befindet sich bei den WW-Domänen **108** und **109** in einer stark helikal geprägten Konformation, wohin gegen die synthetisierten Domänen **105** und **106** an dieser Position einen gegenteiligen Trend aufweisen.

Da die CSD-Werte keine konkrete Aussage über die Stabilität bzw. den Faltungsgrad der einzelnen Sekundärstrukturen oder der gesamten Tertiärstruktur zulassen, werden im Folgenden zwei Möglichkeiten diskutiert, wie Faltungspopulationen des β -Faltblattes der WW-Domänen mit Hilfe der hier erarbeiteten, allgemeingültigen Methode bestimmt und bewertet werden können. Die erste Möglichkeit zu einer Bewertung der Faltungspopulation des dreisträngigen β -Faltblattes liegt in einer Bestimmung der Gesamtpopulation der Tertiärstruktur. Hierzu wird mit Hilfe von Gleichung 8 der ACS-Wert jedes einzelnen β -Strangs, der an der Ausbildung des β -Faltblattes beteiligt ist, ermittelt. Durch die Bildung des arithmetischen Mittels (s. Gl. 10) wird der gesamte ACS-Wert (ACS_{ges.}) bestimmt.

$$(\text{ACS}_{\text{Strang1}} + \text{ACS}_{\text{Strang2}} + \text{ACS}_{\text{Strang3}}) / 3 = \text{ACS}_{\text{ges.}} \quad (10)$$

Durch einsetzen des ACS-Gesamtwertes in Gleichung 9 kann somit eine Faltungspopulation des gesamten β -Faltblattes ermittelt werden. Als *random coil* Werte zur Bestimmung der 0%-Faltungsreferenz dienen auch hier die Werte von WISHART (s. Tabelle 6).^[163] Die ermittelten

Werte für die ACS-Werte als auch der Faltungspopulation für die synthetisierten und literaturbekannten WW-Domänen sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Tabelle 10: Zusammenfassung der ACS-Werte zur Bestimmung der Gesamtfaltungspopulation des β -Faltblattes der Pin1 WW-Domänen sowie der chemischen Verschiebungen der Faltungsindikatoren.

Pin1-WW-Domäne (KLPPGWEKRM- <i>turn</i> -VYYFNHITNASQF/WERPS)					
--M- <i>turn</i> -V--	ACS	δH_β Arg ⁹	δH_γ Pro ³⁰	δH_β Asn ¹⁹	FP
--M-SRSSGR-V-- 108 ^[230]	5.040	0.100	0.030	-0.640	100
--M-FRSNGT-V-- 109 ^[234]	4.994	-0.083	-0.093	-0.733	91
--M-FANGT-V-- 110 ^[234]	4.981	-0.139	-0.071	-0.720	89
--M-SHot=TapR-V-- 105	4.968	0.301	0.077	-0.667	87
--M-SDGR-V-- 106	4.958	0.364	0.096	-0.625	85
<i>random coil</i> ^[163]	4.506	-	-	-	0

Die Werte in Tabelle 10 verdeutlichen, dass alle Peptide einen hohen Faltungsgrad der Tertiärstruktur aufweisen. Die in relation stärkste Faltung weist dabei die native Sequenz der Pin1 WW-Domäne mit dem *bulge-turn* (SRSSGR) auf, wohingegen die beiden synthetisierten WW-Domänen mit einem β -turn nur eine Faltungspopulation von 87% (**105**) und 85% (**106**) besitzten. Daraus kann gefolgert werden, dass die hohe Flexibilität des *loop 1* durch eine Rigidifizierung wie sie durch die hier angewandten Mutationen in den Peptiden **105** und **106** erfolgt ist, eine, wenn auch nur in geringem Maße, destabilisierende Wirkung auf die Tertiärstruktur zur Folge hat. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Ergebnissen von MATTHIAS KÖRLING zur Stabilisierung des zentralen β -hairpins im Foldon-Miniprotein.^[212] Weiterhin ist aus Tabelle 10 ersichtlich, dass im Falle der WW-Domänen die Stärke der Signaldispersion der Faltungsindikatoren (H_β -Arg⁹, H_γ -Pro³⁰, H_β -Asn¹⁹) nicht in einem direkten Zusammenhang mit der Faltungspopulation stehen und daraus, genau wie bei den CSD-Werten kein prozentualer Wert für den Faltungsgrad abgeleitet werden kann. Dennoch besitzt die Methode zur Bestimmung der Gesamtfaltungspopulation den Nachteil, dass keine genauen Aussagen über die einzelnen Sekundärstrukturen ($\beta 1$ und $\beta 2$) der WW-Domänen gemacht werden können, obwohl aus den CSD-Werten bereits ersichtlich ist, dass diese sich in ihrer Stabilität und konformativen Definition deutlich voneinander unterscheiden. Daher stellt eine Bestimmung der Faltungspopulation der einzelnen Sekundärstrukturen, zur korrekten Bewertung der gesamten Tertiärstruktur, eine sinnvollere Alternative dar und ermöglicht zusätzlich einen genaueren Einblick in die konformative Stabilität der einzelnen Teilstrukturen von Proteinen. Zur Bestimmung der Faltungspopulation der einzelnen β -sheets der Pin1 WW-Domänen werden, wie zuvor zur Bestimmung der Gesamtfaltungspopulation

beschrieben, zunächst die ACS-Werte der einzelnen β -Stränge mit Hilfe von Gleichung 8 bestimmt und dann das arithmetische Mittel des ACS-Wertes der am jeweiligen β -sheet beteiligten β -Stränge gebildet (s. Gl. 11).

$$\begin{aligned} (\text{ACS}_{\text{Strang1}} + \text{ACS}_{\text{Strang2}})/2 &= \text{ACS}_{\beta1} \\ (\text{ACS}_{\text{Strang2}} + \text{ACS}_{\text{Strang3}})/2 &= \text{ACS}_{\beta2} \end{aligned} \quad (11)$$

Mit Hilfe von Gleichung 9 kann nun die Faltungspopulation der einzelnen β -sheets der WW-Domänen bestimmt werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11: Zusammenfassung der ACS-Werte der einzelnen β -sheets und der daraus resultierenden Faltungspopulationen der Pin1 WW-Domänen.

Pin1-WW-Domäne (KLPPGWEKRM-turn-VYYFNHITNASQF/WERPS)				
--M-turn-V--	ACS $\beta1$	ACS $\beta2$	FP $\beta1$	FP $\beta2$
--M-SRSSGR-V-- 108 ^[230]	4.904	5.158	100	100
--M-FRSNGT-V-- 109 ^[234]	4.850	5.108	87	92
--M-FANGT-V-- 110 ^[234]	4.833	5.102	82	91
--M-SHot=TapR-V-- 105	4.816	5.122	78	94
--M-SDGR-V-- 106	4.804	5.107	75	92
random coil ^[163]	4.504	4.533	0	0

Aus den Daten von Tabelle 11 ist zu erkennen, dass die Faltungspopulationen des $\beta2$ -sheet höher sind als die des $\beta1$ -sheet, was im Einklang mit den CSD-Werten steht und diese besser widerspiegelt als die Bestimmung der Gesamtfaltungspopulation (vgl. Tab. 10). Weiterhin kann im Falle der synthetisierten Peptide **105** und **106** auch die These bestätigt werden, dass die Einführung eines rigideren β -turns an Stelle des *bulge-turns* einen destabilisierenden Effekt auf das $\beta1$ -sheet hat, da die Faltungspopulationen dieser beiden Peptide von allen hier verglichenen WW-Domänen am niedrigsten sind. Somit liefert die Einzelbestimmung der Faltungspopulationen der jeweiligen Sekundärstruktureinheiten der Proteine zusammen mit den CSD-Werten ein konsistentes Bild über die Struktur der Tertiärstruktur von Proteinen. Damit konnte gezeigt werden, dass auch in der Umgebung von komplexen Systemen die hier erarbeitete Methode zur Bestimmung der Faltungspopulation angewendet werden kann und einen tieferen Einblick in die Stabilität sowie eine Bewertung des Einflusses von Mutationen auf Tertiärstrukturen zulässt. Durch die simple Anwendbarkeit und leicht zu reproduzierenden Parameter der Analytik ist diese Methode allen anderen Literaturbekannten Systemen zur Bewertung eines Faltungsgrades von Sekundär- und Tertiärstrukturen vorzuziehen.

3.3 Succinimid-Thioether-Ligation

Im Rahmen dieser Arbeit sollte, die bereits zuvor bei den zyklischen Hexapeptiden (s. Kap. 3.1) angewandte, regioselektive Reaktion von *N*-terminalen Maleimiden mit einer β -Thioamino­säure, auch im Hinblick auf die Synthese von β -hairpin Peptiden untersucht werden. Da diese Reaktion unter der Ausbildung des zum Aspartimid isosteren Succinimid-Thioethers verläuft, wurde für die Synthese von Oligo- und Polypeptiden der Begriff der Succinimid-Thioether-Ligation (STL), in Anlehnung zur nativen chemischen Ligation (NCL), eingeführt. Diese Nomenklatur soll verdeutlichen, dass es sich nicht nur um eine Biokonjugation durch eine thio-MICHAEL-Addition handelt, sondern um den selektiven Aufbau von Peptiden unter Erhalt des nativen Peptidrückgratregisters (vgl. Abbildung 16). Des Weiteren war die Vorgabe, die STL bei Raumtemperatur durchzuführen, um etwaige Selbstassemblierung der Peptide und deren Einfluss auf das Diastereomerenverhältnis der Succinimid-Thioether hin untersuchen zu können.

3.3.1 Ligation des isolierten Foldon β -hairpins

Zur Evaluierung der Methode wurde, wie bereits in Kapitel 3.2, der in Lösung stabile, isolierte Foldon β -hairpin (KQAYVRKDGEWVLLSG) als Modellverbindung herangezogen. Basierend auf

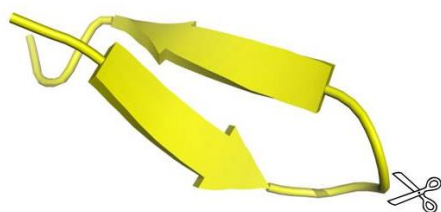


Abb. 42: Ligation durch Synthese von zwei Teilsträngen des Foldon β -hairpins, die durch den gedanklichen schnitt im β -turn entstehen

der These von CAPASSO *et al.*, dass Aminosuccinimide einen *turn*-induzierenden Charakter besitzen, sollte daher der isostere Succinimid-Thioether innerhalb des β -turns des Foldon *hairpins* untersucht werden.^[111] Wird die Synthese solcher Succinimid-Thioether beinhalten­den β -hairpins retrospektiv betrachtet, werden zwei Teilstränge benötigt, die durch den gedanklichen Schnitt zwischen der *i*+1- und *i*+2-Position

des β -turns entstehen (s. Abbildung 42). Die Synthese der Einzelstränge wurde mittels SPPS nach dem Fmoc/^tBu Protokoll unter Verwendung der in Kap. 3.1 beschriebenen Maleimid-Dipeptidbausteine durchgeführt. Die Ligation der einzelnen Peptidstränge erfolgte dann in einer thio-MICHAEL-Addition. Hierzu wurden die Peptide in einem 1:1 Verhältnis in DMSO gelöst (*c* = 0.2 M) und bis zum vollständigen Umsatz bei RT stehen gelassen. Durch Aufbringen der Reaktionslösung auf eine präparative RP-HPLC-Säule konnte das Ligationsprodukt isoliert werden. Die Strukturaufklärung erfolgte anschließend mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten. Um eine Faltung der Peptidsekundärstruktur zu gewährleisten, wurden

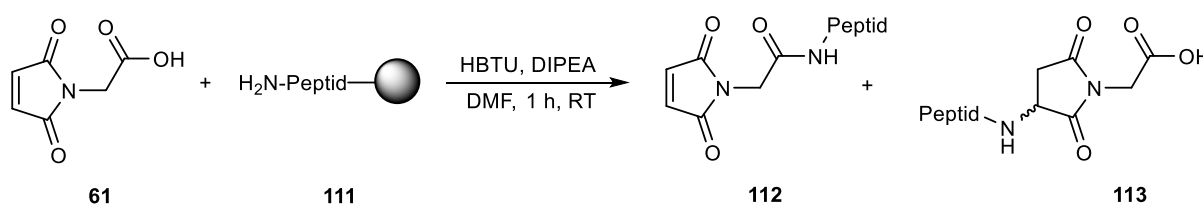
alle Peptide in einem 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit D₂O (11:1) bei einem pH-Wert von drei vermessen.

3.3.1.1 Synthese der Einzelstränge des Foldon β -hairpins

Die Synthese der linearen Vorläuferpeptide für die STL wurde, wenn nicht anders vermerkt, analog zu den in Kapitel 3.2.1.2 beschriebenen Bedingungen mit Hilfe der automatisierten, mikrowellenunterstützten Festphasensynthese unter Verwendung eines 2-CTC-Polystyrolharzes als Trägermaterial durchgeführt.

3.3.1.1.1 Optimierung der Maleimid-Peptidsynthese durch mikrowellen-unterstützte SPPS

In der vorangegangenen Masterarbeit konnte gezeigt werden, dass bei der Synthese von C-terminalen Maleimid-Peptiden die Kupplungszeit der Maleimid-Dipeptide einen erheblichen Einfluss auf die Reinheit der Peptide hat. Grund hierfür ist die hohe Reaktivität der Maleimid-Doppelbindung, die während der Kupplungsreaktion von dem freien Amin des N-Terminus nukleophil angegriffen werden kann. Hierdurch kommt es zur Ausbildung eines N-terminalen Aminosuccinimides, wodurch das Peptid nach der Abspaltung vom Trägerharz zwei C-Termini besitzt. Diese Verbindungen sind für den weiteren Einsatz in der STL unbrauchbar. Bei einer Kupplungszeit von einer Stunde, die typisch für die manuelle SPPS ist, liegt der Anteil dieser unerwünschten Nebenreaktion bei 25% (s. Schema 32).^[165]



Schema 32: Nebenreaktion von ungeschützten Maleimid-Dipeptidbausteinen während der SPPS mit einer Stunde Kupplungszeit. Der Anteil des unerwünschten Aminosuccinyl-Nebenproduktes **113** liegt unter den gegebenen Reaktionsbedingungen bei 25%.

Um das Problem eines nukleophilen Angriffes an die Maleimid-Doppelbindung zu umgehen, wurde die in Kapitel 3.1 beschriebene Schützung der Doppelbindung mit Furan in einer DIELS-ALDER-Reaktion etabliert. Diese Methode erwies sich für die Synthese der zyklischen

Hexapeptide als äußerst praktikabel, da die Entschützung in einer *one pot* Reaktion zusammen mit der Zyklisierung stattfindet. Im Falle der Synthese zur Darstellung der linearen Vorläuferpeptide für die STL bedeutet dies jedoch einen zusätzlichen Entschützungsschritt des Maleimid-Peptidstranges unter der Berücksichtigung, dass die STL der Einzelstränge bei Raumtemperatur erfolgen soll. Daher sollte überprüft werden, inwiefern eine Synthese von Maleimid-Peptiden mit den ungeschützten Maleimid-Dipeptidbausteinen möglich ist, um die gesamte Reaktionszeit zu minimieren und die STL dadurch zeiteffizient zu gestalten.

Durch die Anschaffung des mikrowellenunterstützten Peptidsynthesizers *Liberty Blue* der Firma CEM im Arbeitskreis GEYER konnte die Synthese von C-terminalen Maleimid-Peptide optimiert werden. Die Kupplungszeit des *Liberty Blue* beträgt bei der Verwendung eines 2-CTC-Harzes und einer Reaktionstemperatur von 50 °C nur 600 s. Das bedeutet eine um den Faktor sechs verkürzte Reaktionszeit im Vergleich zur manuellen Peptidsynthese. Hierdurch wird ein theoretisches Maximum von 4% des Aminosuccinimid-Nebenproduktes **113** erwartet. Um dies zu überprüfen wurde ein Tetrapeptid mit dem Maleimid-Dipeptidbaustein Mal=Gly unter den Standardbedingungen des mikrowellenunterstützten Peptidsynthesizers synthetisiert. Das ¹H-NMR-Spektrum des Rohpeptides **114** (Mal=Gly-Val-Gly) zeigte keine Verunreinigungen durch das Aminosuccinyl-Nebenprodukt **113** (s. Abbildung 43).

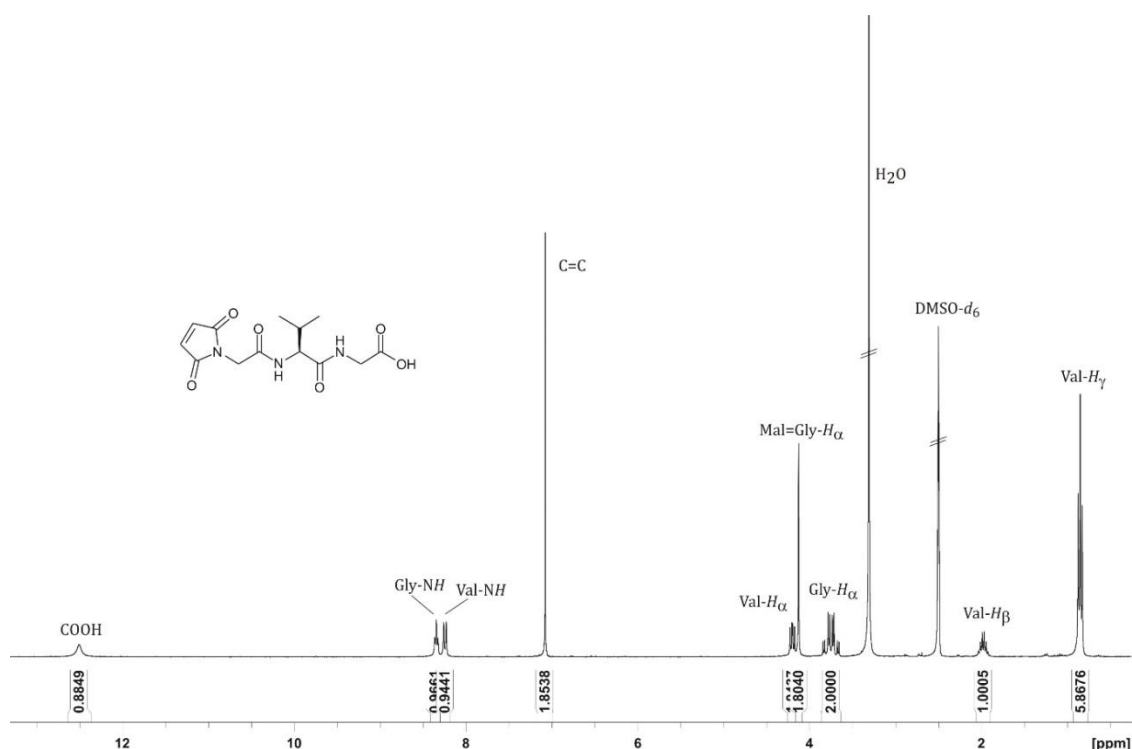


Abbildung 43: ¹H-NMR-Spektrum (300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆) des Rohpeptides **114**. Durch die verkürzte Kupplungszeit am mikrowellenunterstützten Peptidsynthesizer LIBERTY BLUE wird keine Bildung des Aminosuccinyl-Nebenproduktes während der Kupplung beobachtet. Dies ermöglicht die Synthese von Maleimid-Peptiden ohne eine vorherige Schützung der Maleimid-Dipeptidbausteine mit Furan.

Da das Tetrapeptid **114** ausschließlich Aminosäuren ohne funktionelle Gruppen in der Seitenkette trägt, wurde zunächst überprüft, ob es eine Limitierung in der Synthese von *N*-Terminalen Maleimid-Peptiden durch reaktive Aminosäureseitenketten gibt. Hierzu wurden unterschiedliche C-terminale Teilstränge des Foldons synthetisiert.

- Mal=Gly-Trp-Val-Leu-Leu-Ser-Thr-Phe-Leu **115**
- Mal=Gly-Glu-Trp-Val-Leu-Leu-Ser-Gly **116**
- Mal=Gly-Trp-Val-Leu-Leu-Ser-Gly **117**

Es zeigte sich, dass die Peptide **115-117** ohne eine Nebenreaktion der Maleimid-Doppelbindung in guten Ausbeuten und einer hohen Reinheit der Rohpeptide von >85% dargestellt werden können. Um die Methode jedoch wirklich ohne Limitierung einsetzen zu können, wurde auch die Synthese von Maleimid-Peptiden mit einem Cystein innerhalb der Sequenz untersucht. Dabei stand besonders im Fokus das hier in der SPPS standardmäßig verwendete Fmoc-Cys(Trt)-OH zur Synthese der Peptide zu verwenden und nicht die Schutzgruppenstrategie zu wechseln. Daher wurde der Ansatz einer selektiven Seitenkettenschutzgruppen-Entschützung verfolgt. Zur Entwicklung dieser Methode diente die Aminosäuresequenz Mal=Gly-Trp-Val-Leu-Leu-Cys-Gly **118** als Modellpeptid. TSIKARIS *et al.* konnte durch die Verwendung von 1,3-Dimethoxybenzol (DMB) als *scavenger* während der Abspaltung der Peptide mit TFA vom Trägermaterial zeigen, dass die Tritylschutzgruppe (Trt) der Cystein-Seitenkette nicht entfernt wird.^[197] DMB fängt die während der Abspaltung entstehenden Kationen der Schutzgruppen durch eine elektrophile aromatische Substitution ab. Da die nukleophile Substitution des Schwefels an das Tritylkation jedoch schneller ist als die aromatische Substitution des Kations an den Benzolring, bleibt das Cystein geschützt. Interessant ist dabei, dass in Gegenwart von Boc-Schutzgruppen auch keine *tert*-Butylierung des Schwefels beobachtet wird und tritylgeschützte Histidin-Seitenketten vollständig entschützt werden.^[197] Durch die Verwendung einer Abspaltlösung bestehend aus TFA/DMB/H₂O (95:3:2) und einer Reaktionszeit von 1.5 h konnte das Modellpeptid **118** mit einer tritylgeschützten Cysteinseitenkette erhalten werden (Mal=Gly-Trp-Val-Leu-Leu-Cys(Trt)-Gly).

Somit ist der "*proof of principle*" erbracht und die Synthese von Maleimid-Peptiden kann ohne Limitierungen in der Peptidsequenz und unter Verwendung der Standard Fmoc-Aminosäuren in der automatisierten SPPS durchgeführt werden. Cysteinhaltige Maleimid-Peptide können hierdurch ohne eine auftretende Konkurrenzreaktion zwischen dem Thiol an der Ligationsstelle des *N*-terminalen Peptidstranges und dem Thiol der Cystein-Seitenkette des *C*-terminalen Maleimid-Peptides in der STL eingesetzt werden. Durch eine Behandlung des ligierten Peptides mit TFA kann die Cysteinseitenkette posttranslational entschützt werden.

3.3.1.2 Einfluss der β -turn-Position des Succinimides und der Stereokonfiguration des Cysteins auf die β -hairpin Struktur

Die eingangs in Kapitel 1.3 erwähnten Ergebnisse von SATOW sowie CAPASSO *et al.* zeigten, dass ein Aspartimid innerhalb eines β -turns in Abhängigkeit seiner globalen Umgebung an der $i+1$ und $i+2$ -Position stabilisierend wirken kann.^[105,106,111,115] Die detaillierte Analyse der in Kapitel 3.1 diskutierten zyklischen Hexapeptide zeigte, dass die zum Aspartimid isosteren Succinimid-Thioether in diesen β -hairpin Modellen eine ungewöhnliche und hier erstmals beschriebene Stereodynamik aufweisen. Um weitere Aussagen über den konformativen Einfluss des isosteren Succinimid-Thioethers jenseits eines rigiden zyklischen Peptidrückgrates machen zu können, wurde ein „Succinimid-Scan“ innerhalb des β -turns an der i - bis $i+3$ -Position des Foldon β -hairpins durchgeführt (s. Abbildung 44). Das Konzept des systematischen Austausches einer Aminosäure wurde erstmals von MERRIFIELD *et al.* im Rahmen einer Studie zur Aufklärung des Effektes der Tyrosin¹²⁰-Seitenkette, in dem Enzym Ribonuklease, auf die Bindungsaffinität beschrieben.^[236]

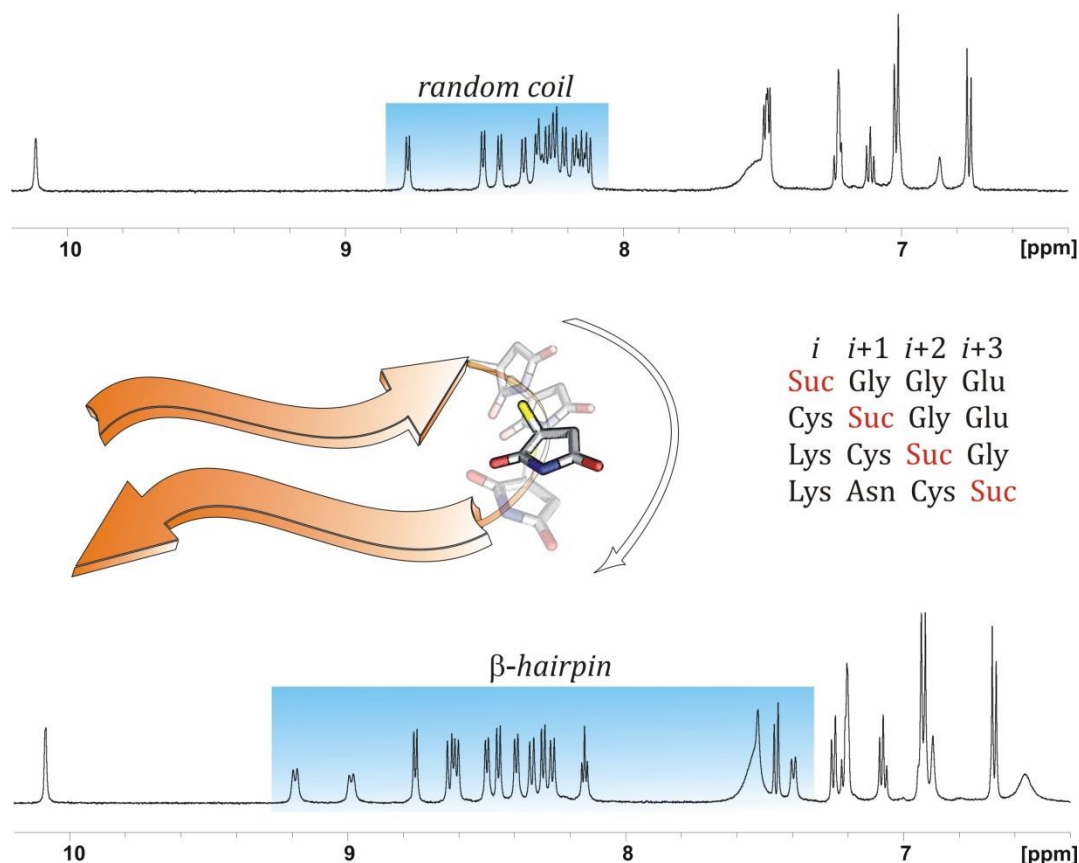


Abbildung 44: Anhand eines „Succinimid-Scans“ innerhalb des β -turns der isolierten Foldon β -hairpins (KQAYVRK-turn-WVLLSG) von der i - bis $i+3$ -Position soll der konformationelle Einfluss des isosteren Succinimid-Thioethers auf die Sekundärstruktur untersucht werden. Dabei erfolgte parallel ein Scan zur Auswirkung der in N -terminaler Richtung zum Succinimid-Ring benachbarten Stereokonfiguration des Cysteins.

Basierend auf diesen Ergebnissen etablierte sich besonders der sogenannte *Alaninscan*. Dieser beruht jedoch im Gegensatz zur Punktmutation von nur einer Position auf dem systematischen, sequenziellen Austausch jeder Aminosäure gegen Alanin.^[237–240] Da Alanin die kleinste natürlich vorkommende chirale Aminosäure ist und nur eine Methylgruppe an der β -Position als Seitenkette aufweist, kann durch diese Mutation besonders gut der Einfluss von Aminosäureseitenketten auf die Struktur sowie Bindungsaffinität verifiziert werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass Alanin, im Gegensatz zu dem sehr flexiblen Glycin, keinen negativen Einfluss auf die Ausbildung einer Sekundärstruktur aufweist. Solche *Scanmethoden*, bei denen systematisch jede Aminosäure der Peptidsequenz durch eine andere natürliche oder unnatürliche Aminosäure ersetzt wird, spielen daher eine wichtige Rolle im Verständnis für die Zusammenhänge zwischen der Struktur von Peptiden, Proteinen oder Enzymen und deren biologischer Aktivität.^[241] So finden neben dem *Alaninscan* auch D-Aminosäure-Scans^[242,243] oder *Scans* mit rigiden Pyridon-Dipeptideinheiten^[185] Anwendung zur Aufklärung von Struktur-Wirk-Mechanismen. Für den hier angewandten *Succinimid-Scan* kann im speziellen noch die von KESSLER *et al.* geprägte Begrifflichkeit des „*spatial screening*“ angeführt werden, da durch das Einführen des Succinimides ein β -turn induziert werden soll.^[172,244,245] Ein weiteres Beispiel für *spatial screening* ist der doppel-D-Scan von gegenüberliegenden Aminosäuren eines β -hairpins.^[246]

Weiterhin sollte parallel zum *Succinimid-Scan* auch der Effekt des in N-terminaler Richtung zum Succinimid benachbarten Stereozentrums des Cysteins auf die Sekundärstrukturbildung untersucht werden. In Tabelle 12 sind alle Peptid-Analoga (**119–126**) des Succinimid- sowie Cystein-Scans aufgelistet.

Tabelle 12: Übersicht der systematisch synthetisierten Succinimid-Thioether beinhaltenden Foldon β -hairpins des Succinimid-Scans. Diese werden in den folgenden Kapiteln beschrieben und hinsichtlich ihrer Struktur diskutiert.

Nr.	N-Term	<i>i</i>	<i>i+1</i>	<i>i+2</i>	<i>i+3</i>	C-Term
96	KQAYVR	Lys	Asp	Gly	Glu	WVLLSG (nativ)
119	KQAYVC	Suc	Gly	Gly	Glu	WVLLSG
120	KQAYVR	Cys	Suc	Gly	Glu	WVLLSG
121	KQAYVR	Lys	Cys	Suc	Gly	WVLLSG
122	KQAYVR	Lys	Asn	Cys	Suc	GVLLSG
123	KQAYVc	Suc	Gly	Gly	Glu	WVLLSG
124	KQAYVR	cys	Suc	Gly	Glu	WVLLSG
125	KQAYVR	Lys	cys	Suc	Gly	WVLLSG
126	KQAYVR	Lys	Asn	cys	Suc	GVLLSG

Bereits bei den in Kapitel 3.1 beschriebenen zyklischen Hexapeptiden zeigte die Stereodynamik der Succinimid-Thioether eine signifikante Abhängigkeit von der Stereokonfiguration des benachbarten Cysteins. Im Falle des Hexapeptides **93** konnte so durch die Änderung von L-Cystein zu D-Cystein ein stabilisierender Effekt auf die Stereodynamik nachgewiesen werden. Anhand dieses Befundes standen besonders die ligierten Foldon β -hairpins mit D-Cystein (**123-126**) im Fokus. Ziel der beiden *scans* sollte somit die Identifizierung einer geeigneten Ligationsstelle für die STL sein, die die Synthese eines stabilen, nativ faltenden Foldon β -hairpins ermöglicht. Das überraschende Ergebnis des Screenings war, dass von den acht durch die STL synthetisierten *hairpins* (**119-126**) nur in zwei Fällen die beiden zu erwartenden Diastereomere im analytischen RP-HPLC-Chromatogramm unterscheidbare Retentionszeiten aufwiesen.

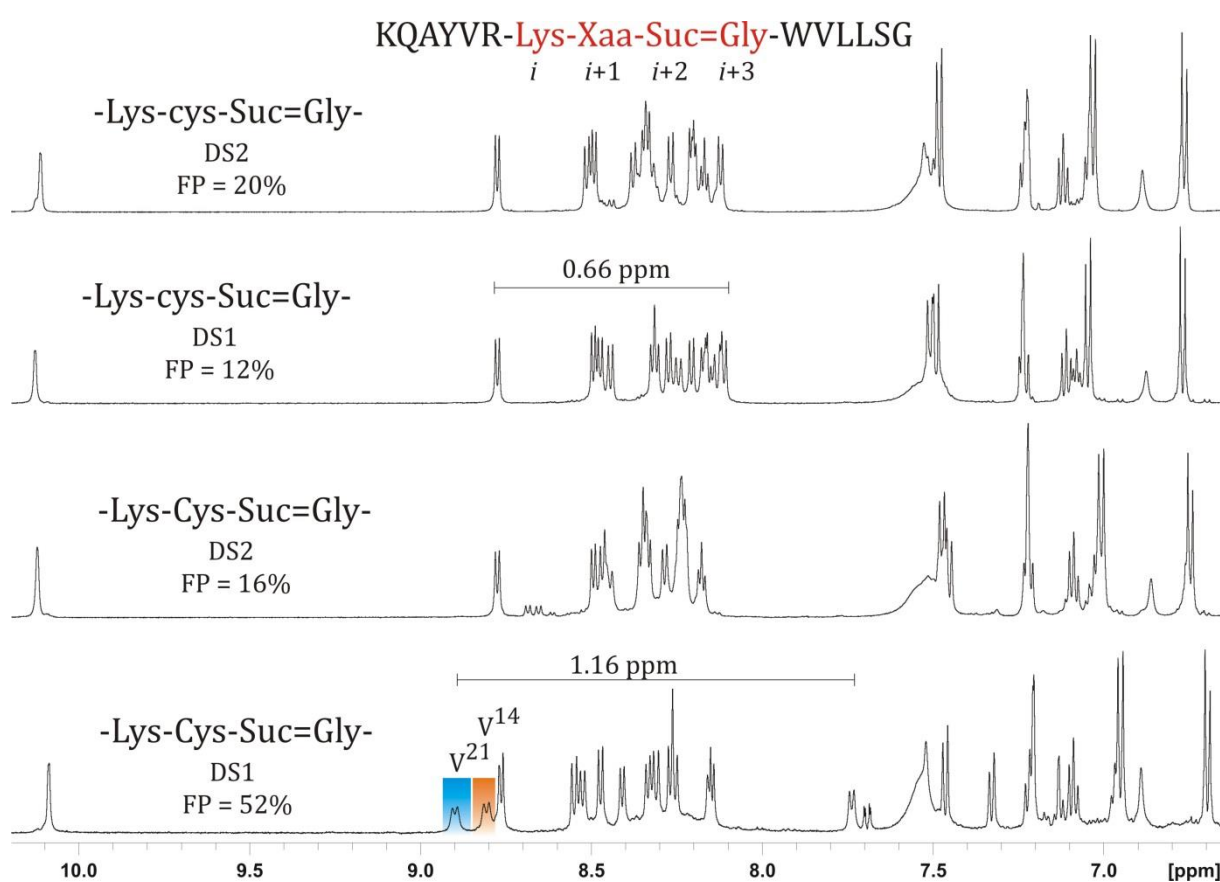


Abbildung 45: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0) im amidischen Bereich der vier diastereomer zueinander stehenden, ligierten Foldon β -hairpins mit dem Suc=Gly-Dipeptid an $i+2$ - und $i+3$ -Position des β -turns. Lediglich das Diastereomer des L-Cystein Peptides **121-DS1** (unten) weist in Lösung eine Vorzugskonformation auf, die sich in den Foldon β -hairpin charakteristischen Tieffeldverschiebungen der Valin-Amidprotonen äußert. Peptide von unten nach oben: **121-DS1/DS2**, **125-DS1/DS2**.

Da auch bei den Succinimid-Thioether beinhaltenden Foldon β -hairpins mit Hilfe der NMR-Spektroskopie keine eindeutige Zuordnung der absoluten Stereokonfiguration des Stereozentrums am Succinimid-Ring möglich war, werden auch hier im Folgenden die

Diastereomere gemäß ihrer Retentionszeit mit DS1 und DS2 bezeichnet (vgl. Kap. 3.1.4). Besonders interessant an diesem Befund ist die Tatsache, dass sich in beiden Peptiden **121** und **125** der Succinimid-Ring an der *i*+2-Position des β -turns befindet (vgl. Tab. 12) und sich beide nur in der Stereokonfiguration des Cysteins unterscheiden. Die Analyse der NMR-spektroskopischen Daten der vier diastereomeren Peptide (**121/125-DS1**, **121/125-DS2**) zeigte, dass wiederum nur eines dieser Diastereomere, **121-DS1**, die für den Foldon β -hairpin charakteristischen Tieffeldverschiebungen der Valin-Amidprotonen (V^{14} und V^{21}) und eine Faltungspopulation von 52% aufwies (s. Abbildung 45). Alle anderen Peptide wiesen, sofern bestimmbar, Faltungspopulationen von <20% auf und können somit als *random coil* Struktur angesehen werden. Um einen genaueren Einblick in die Struktur des β -hairpins und den konformationellen Einfluss der Succinimid-Thioether-Einheit im Bereich des β -turns von Peptid **121-DS1** zu erlangen, wurde eine Konformationsanalyse durchgeführt und mit dem nativen Foldon β -hairpin verglichen.

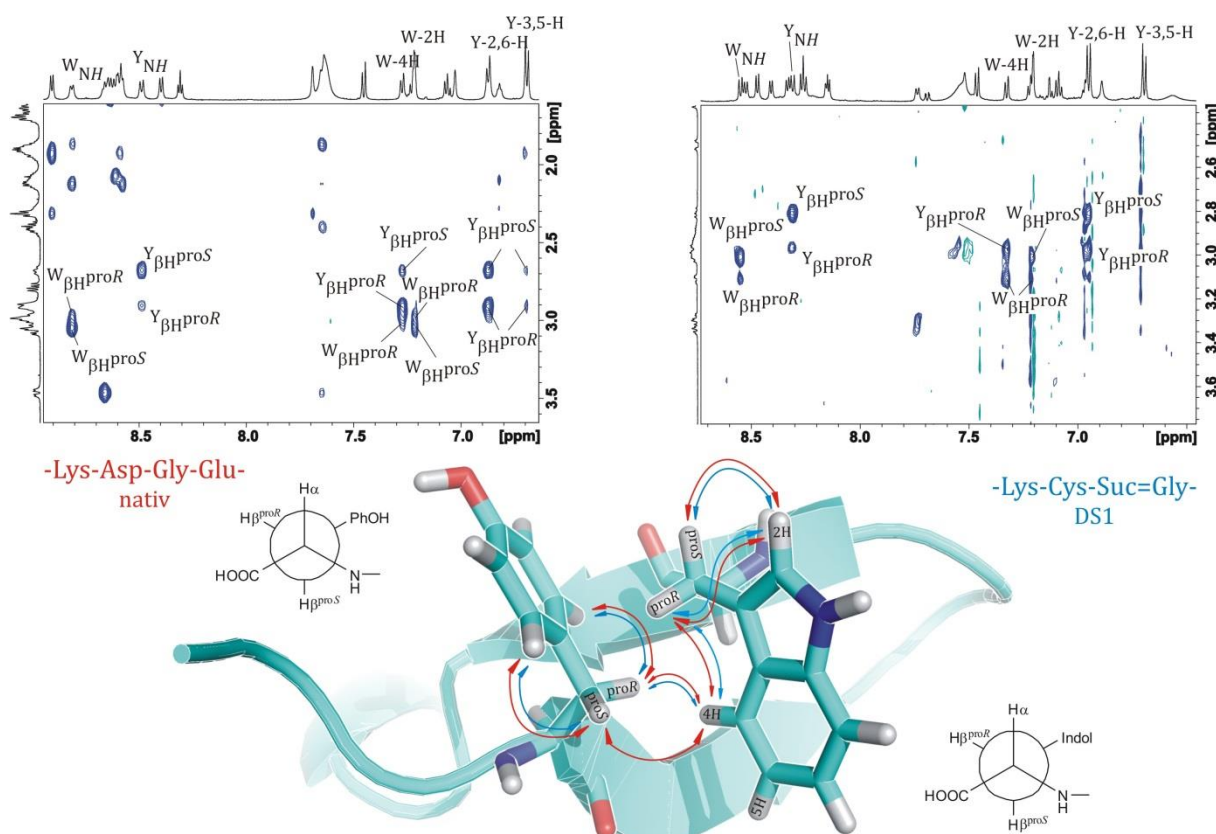


Abbildung 46: Konformationsanalyse und Vergleich der NOESY-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/D₂O (11:1), pH = 3.0, Mischzeit = 150 ms) des nativen Foldon β -hairpins **96** KQAYVR**KDGE**WVLLSG (links) mit dem ersten Diastereomer des K-Cys^{*i*+1}- Σ G-Foldon β -hairpin **121-DS1** KQAYVR**KCGW**VVLLSG (rechts) im Teilbereich des hydrophoben clusters, bestehen aus Tyr¹³ und Trp²⁰. Die Kontakte sind zur Verdeutlichung in einen Ausschnitt aus der Kristallstruktur des Foldons (PDB-Code: 1RFO) eingetragen.

Es zeigte sich, dass die Seitenkettenrotamere der Aminosäuren des β -sheets von **121-DS1** keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum nativen Foldon β -hairpin **96** aufwiesen. Durch die Auswertung des NOESY-NMR-Spektrums im Bereich des hydrophoben *clusters* bestehend aus Arg¹⁵, Trp²⁰, Tyr¹³ und Leu²² konnte außerdem durch die NOE-Kontakte zwischen Trp²⁰ und Tyr¹³ bewiesen werden, dass der β -hairpin **121-DS1** eine identische Struktur im Vergleich zum nativen Foldon β -hairpin **96** aufweist (vgl. Abbildung 46). Der einzige Unterschied zwischen den beiden Peptiden **121-DS1** und **96** liegt in ihren unterschiedlichen Faltungspopulationen des β -sheets von 52% und 72%. Auch das Fehlen des NOE-Kontaktes vom Trp-4H zum Tyr- β H-proS steht im Einklang mit der geringen Faltungspopulation von **121-DS1**, da dies auf eine gesteigerte intrinsische Flexibilität des β -hairpins hindeutet. Da mit diesen Ergebnissen bereits der Nachweis erbracht werden konnte, dass die Ausbildung eines nativ faltenden Foldon β -hairpins durch die STL möglich ist, stellt sich dennoch die Frage, welchen Einfluss der Succinimid-Thioether auf den β -turn hat und welche Konformation dieser einnimmt. Obwohl die Konformationsanalyse zeigte, dass der hydrophobe *cluster* in Takt ist und somit auch ein definierter *turn* zur Verbindung der beiden β -Stränge ausgebildet worden sein muss, zeigt sich bereits im ¹H-NMR-Spektrum des Peptides **121-DS1** ein signifikanter Unterschied zum nativen Foldon β -hairpin. Bei den isolierten Foldon *hairpins* weist immer das Amidproton der *i*+3-Position des β II'-turns die stärkste Hochfeldverschiebung auf. Dieser Tatsache liegen zwei Ursachen zu Grunde. Zum einen weisen Amidprotonen, die sich in einer helikalen Umgebung befinden, wie es typisch für die *i*+3-Position eines rechtsgängigen β -turns oder in einer α -Helix ist, immer eine relativ zum *random coil* Wert der Aminosäure gesehene Hochfeldverschiebung auf. Zum anderen befindet sich dieses Amidproton in einer Wasserstoffbrückenbindung mit dem Carbonyl der Aminosäure in der *i*-Position. HODGES sowie WILLIAMSON *et al.* konnten anhand von NMR-Experimenten zeigen, dass Amidprotonen, die sich innerhalb von α -Helices in einer Wasserstoffbrückenbindung befinden, eine Hochfeldverschiebung erfahren und diese in Korrelation mit der Bindungslänge der Wasserstoffbrückenbindung steht.^[247,248] Je stärker eine Wasserstoffbrückenbindung, desto größer ist die Hochfeldverschiebung hin zu kleineren chemischen Verschiebungen.^[248] Aus diesem Grund weisen die Temperaturgradienten des Amidprotons an der *i*+3-Position eines β -turns einen positiven Temperaturgradienten im Gegensatz zu den restlichen Amidprotonen eines β -hairpins auf (vgl. Tabelle 13).

Da bei dem ligierten Foldon β -hairpin **121-DS1** durch den Einsatz des Suc=Gly-Motivs an der *i*+2 und *i*+3-Position kein Amidproton an der *i*+3-Position vorhanden ist, überrascht es umso mehr, dass dennoch ein Amidproton eine nahezu identische Hochfeldverschiebung zu der Glutaminsäure des nativen Foldon β -hairpins aufweist (s. Abbildung 47). Durch Sequenzierung des Peptides mit Hilfe der NOESY- und TOCSY-NMR-Spektren konnte zweifelsfrei zugeordnet

werden, dass es sich hierbei um das Amidproton des Cysteins an der $i+1$ -Position des β -turns handelt.

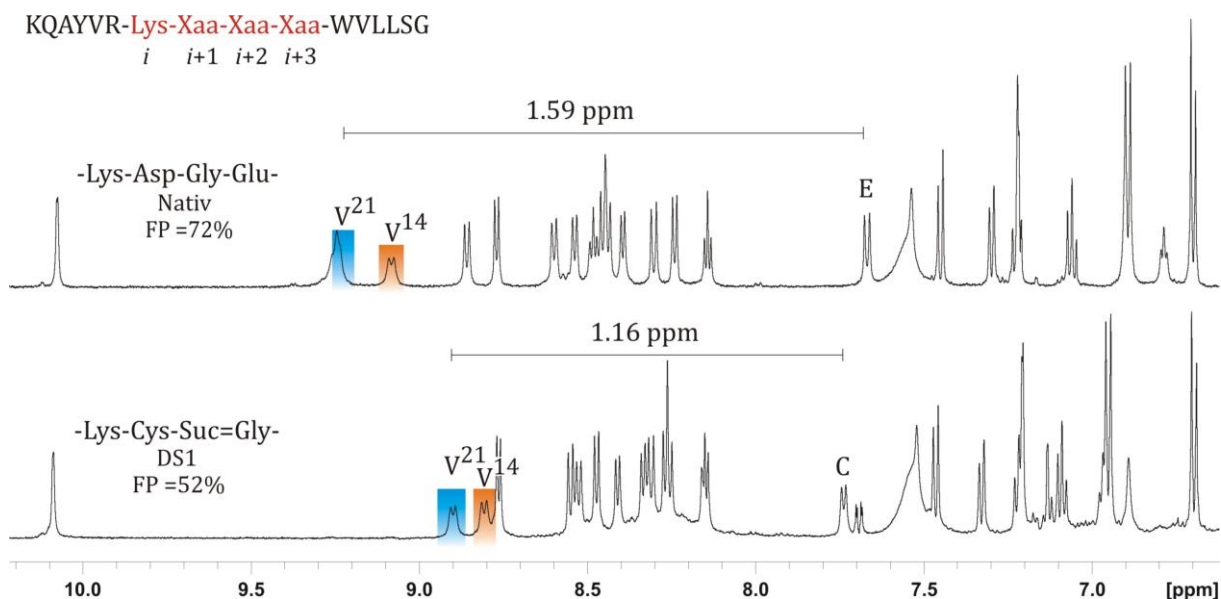


Abbildung 47: ^1H -NMR-Spektren im amidischen Bereich (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0) des nativen Foldon β -hairpins **96** (oben) mit dem ligierten β -hairpin **121-DS1** (unten). Beide Spektren weisen eine hohe Dispersion, sowie die charakteristische Tieffeldverschiebung der beiden Valin-Amidprotonen auf. Außergewöhnlich ist die Hochfeldverschiebung des Cystein-NH, dass sich an der $i+1$ -Position des β -turns von **121-DS1** befindet und einen nahezu identischen Wert zu der typischerweise erwarteten Verschiebung zur Glutaminsäure in der $i+3$ -Position des nativen turns aufweist.

Da im Bereich der vier *turn*-Aminosäuren (KC Σ G) keine weiteren NOE-Kontakte Aufschluss über die *turn*-Geometrie geben konnten, wurde durch die Bestimmung der Temperaturgradienten versucht, die Hintergründe für diese ungewöhnliche Tieffeldverschiebung des Cys¹⁷-NH in **121-DS1** zu beleuchten. Diese werden in Tabelle 13 mit denen des nativen Foldon β -hairpins **96** verglichen.

Tabelle 13: Vergleich der Temperaturgradienten ($\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T$) des nativ faltenden, ligierten Foldon β -hairpin **121-DS1** (unten) mit dem nativen Foldon hairpin **96**. Sofern nicht anders angegeben besitzen alle Werte ein negatives Vorzeichen. Die Einheit der Temperaturgradienten ist [ppb/K].

<i>turn</i>	K	Q	A	Y	V ¹⁴	R	K ⁱ	X ⁱ⁺¹	X ⁱ⁺²	X ⁱ⁺³	W	V ²¹	L ²²	L ²³	S	G
KDGE	-	6.8	9.0	9.3	14.3	6.6	9.4	15.5	9.5	+1.3	10.5	17.6	10.0	9.0	7.7	7.8
KC Σ G	-	10.5	7.0	8.0	9.0	7.5	7.0	2.5	-	-	9.0	13.0	9.5	7.5	6.0	7.5

Die Auswertung der Temperaturgradienten von **121-DS1** bestätigt, dass das Amidproton von Cys¹⁷ sehr stark vom Lösungsmittel abgeschirmt ist. Alle anderen Temperaturgradienten von

121-DS1 weisen keine signifikanten Unterschiede zum nativen Foldon β -hairpin **96** auf. Wird nun die Aussage von KESSLER *et al.* zugrunde gelegt, dass sich Amidprotonen mit einem Temperaturgradienten positiver als -4.5 ppb/K in einer Wasserstoffbrückenbindung befinden,^[146,148] kann für das Cys¹⁷-NH mit einem Wert von -2.5 ppb/K die Vermutung aufgestellt werden, dass sich dieses in einer solchen befindet. Da der Temperaturgradient allein, besonders in kleinen dynamischen Peptiden, jedoch keine sichere Aussage zulässt, haben ANDERSEN *et al.* eine graphische Methode entwickelt die unter Berücksichtigung der CSD-Werte der Amidprotons, durch Auftragen von $\Delta\delta/\Delta T$ gegen CSD_{NH} , eine Einordnung in wasserstoffbrückegebundene und ungebundene Protonen zulässt. Vergleicht man die Daten von ANDERSEN für wasserstoffbrückegebundene Amidprotonen in β -sheets,^[150] mit der ungewöhnlich starken Hochfeldverschiebung des Cystein-NH, die sich in einem CSD-Wert von -0.435 ppm manifestiert, in Kombination des sehr geringen Temperaturgradienten, wird die Annahme weiter bekräftigt, dass sich das Amidproton von Cys¹⁷ in einer Wasserstoffbrückenbindung befindet. Wird nun die Geometrie des β -turns des nativen Foldon β -hairpins **96** betrachtet, der als $\beta II'$ -turn vorliegt, ergibt sich für den Succinimid-Thioether beinhalteten turn aufgrund der Hypothese, dass das Amidproton der $i+1$ -Position sich in einer Wasserstoffbrückenbindung befinden muss, eine interessante turn-Struktur, die basierend auf den analytischen Daten und dieser Annahme in Abbildung 48 dargestellt ist. Im Folgenden wird versucht, auf Basis der spektroskopischen Daten, eine Einordnung bezüglich der β -turn Geometrie des Peptides **121-DS1** zu treffen und diese zu erklären.

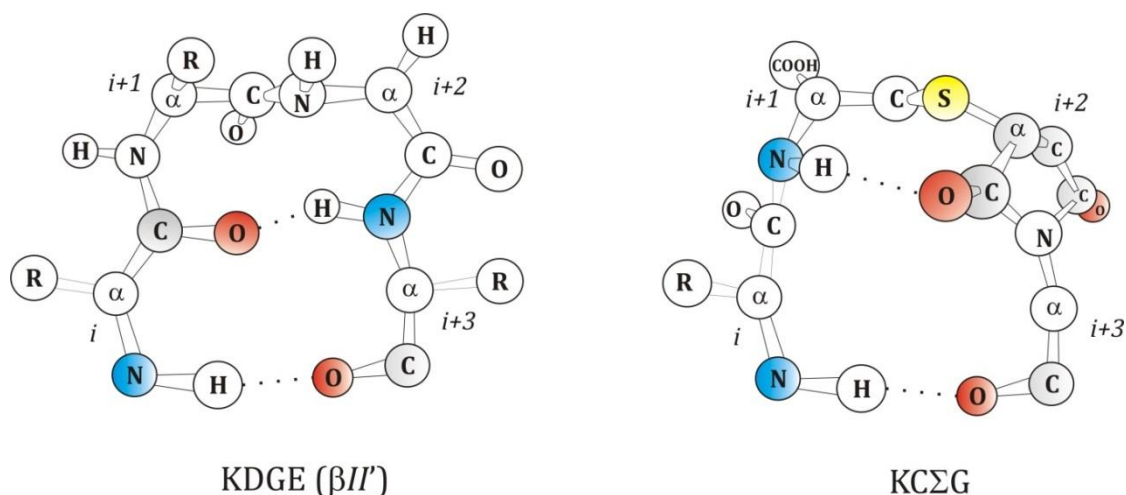


Abbildung 48: Geometrie des für den nativen, isolierten Foldon β -hairpin typischen $\beta II'$ -turns (links)^[176] mit der Sequenz KDGE (**96**) von der i bis $i+3$ -Position im Vergleich mit der aus den NMR-spektroskopischen Daten postulierten Geometrie des β -turns von Peptid **121-DS1** mit einem Thioether zwischen $i+1$ und $i+2$ Position sowie einem Succinimid an der $i+2$ -Position (rechts). Der bemerkenswerteste Unterschied beider turn-Strukturen liegt im Falle des Peptides **121-DS1** in der Ausbildung eines ungewöhnlichen δ -turns zwischen dem Amidproton des Cystein an der $i+1$ -Position und einer der beiden Carbonyle des Succinimid-Rings in der $i+2$ -Position (rechts).

Da zwischen der $i+1$ - und $i+2$ -Position in Peptid **121-DS1** keine Amidbindung ausgebildet wird und sich anstelle dessen, die Seitenkette des Cysteins innerhalb des Peptidrückgrates befindet, führt dies unweigerlich zu einer Rotation um den Winkel ω zwischen i und $i+1$. Durch diese Torsion des Rückgrates wird es möglich, dass sich das sonst sehr stark zum Lösungsmittel hin orientierte Amidproton der $i+1$ -Position ($\Delta\delta/\Delta T > 15$ ppb/K im nativen Foldon *hairpin*) nach innen drehen kann und somit vom Lösungsmittel abgeschirmt wird. Der gegenüberliegende Succinimid-Ring an der $i+2$ -Position des *turns* kann mit seinen zwei potentiellen Wasserstoffbrücken-Akzeptoren das Amid-Proton an der $i+1$ -Position stabilisieren und in einer Wasserstoffbrücke binden (vgl. Abbildung 48). Dies stellt im Vergleich zum nativen Foldon β -*hairpin* den signifikantesten Unterschied dar. Dieser Befund ist insofern außergewöhnlich, da dies bedeuten würde, dass die Einheit bestehend aus Cystein und dem Succinimid-Ring zwischen der $i+1$ - und $i+2$ -Position einen δ -*turn* ausbildet. Dieses *turn*-Motiv ist nahezu unerforscht und kommt im Vergleich zum β -*turn* aufgrund seiner erforderlichen *cis*-Amidbindung nur sehr selten in Peptiden oder Proteinen vor.^[249] Da dieses *turn*-Motiv jedoch nicht zweifelsfrei anhand der hier vorliegenden Daten bewiesen werden kann, muss auch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke des Cys¹⁷-Amidprotons zum freien C-Term von Cys¹⁷ in Betracht gezogen werden. Hierdurch kann ebenfalls ein kleiner Temperaturgradient hervorgerufen werden. Allerdings sollte in diesem Fall jeder nativ faltende, ligierte Foldon β -*hairpin* an dieser Position einen nahezu identischen Temperaturgradienten aufweisen. In Kapitel 3.3.1.4.1 kann anhand des Peptides **157-DS1** demonstriert werden, dass die Stereochemie auf der gegenüberliegenden Seite des *turns* einen Einfluss auf den Temperaturgradienten hat. Dieses Verhalten der Temperaturabhängigkeit kann besser mit einer veränderten Bindungslänge der Wasserstoffbrückenbindung aufgrund der veränderten Geometrie des *turns* erklärt werden als mit dem Vorhandensein einer Wasserstoffbrücke zwischen Amid und C-Term des Cys¹⁷. Einen weiteren Hinweis für die Existenz eines δ -*turns* liefert die Moleküldynamiksimulation, die in Kooperation mit PHILIP HORX durchgeführt wurde. Unter der Berücksichtigung der Wasserstoffbrückenbindung zwischen i - und $i+3$ -Position wurde die Dynamik des ligierten β -*turns* in einem Zeitraum von 10 ns beobachtet. Hierbei zeigte sich insbesondere bei dem β -*turn* mit einem (*S*)-konfigurierten Succinimid-Ring, dass dieser bevorzugt die Konformation eines δ -*turns* einnimmt (s. Abbildung 49).

Unabhängig von der Möglichkeit zur Ausbildung eines δ -*turns* handelt es sich insgesamt betrachtet um einen β -*turn*, da auch anhand des Temperaturgradienten von Lys¹⁶ zu sehen ist, dass die typische Wasserstoffbrückenbindung zwischen der i - und $i+3$ -Position ausgebildet wird.

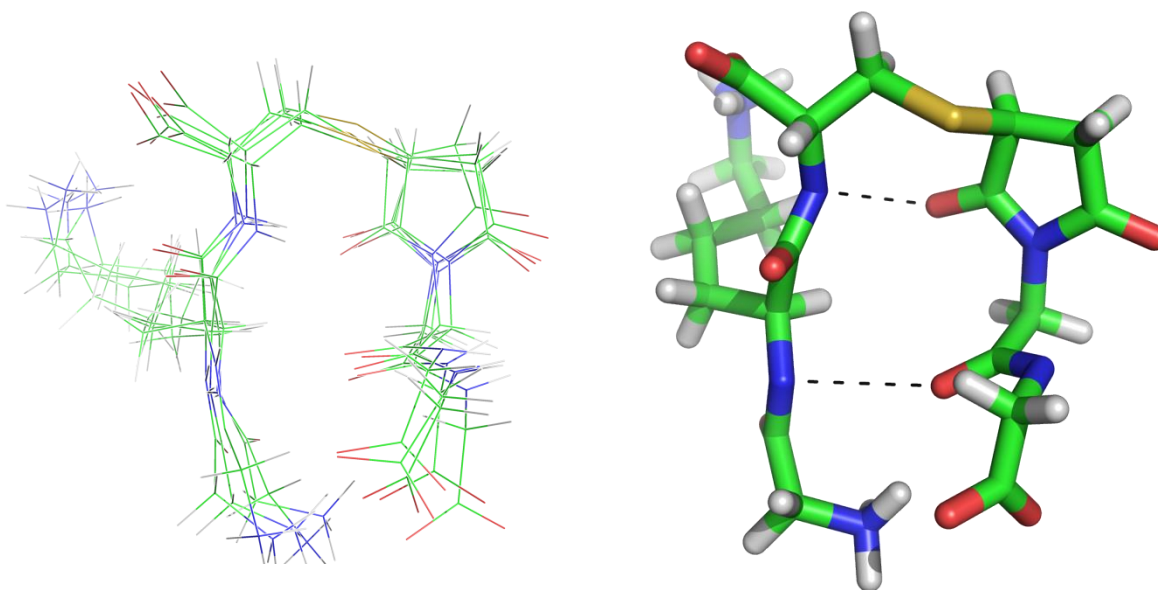


Abbildung 49: Links: Moleküldynamiksimulation (Molecular Operating Environment, 10 ns) des ligierten Foldon β -turns (KCΣG). Rechts: Selektierte Aufnahme aus der Simulation. Zur Durchführbarkeit der Berechnungen wurde C- und N-Terminal der *turn*-Sequenz ein Glycinrest angefügt. Der (*S*)-konfigurierte Succinimid-Ring zeigt während des Zeitintervalls der Simulation eine hohe Tendenz zur Ausbildung des postulierten δ -turns zwischen der *i*+1- und *i*+2-Position, wohingegen der (*R*)-konfigurierte Ring eine deutlich geringere Population des δ -turns während des beobachteten Zeitraums aufwies. Die Berechnungen bestätigen somit die zuvor getroffene Annahme, dass die nativ faltenden, ligierten Foldon β -hairpins innerhalb des β -turns einen zusätzlichen δ -turn ausbilden.

Verglichen mit den von CAPASSO und SATOW *et al.* beschriebenen Aminosuccinimiden (Kap. 1.3), die zu einer Stabilisierung von *turn*-Strukturen durch ihre Rigidität beitragen, weist der Succinimid-Thioether in dem ligierten Peptid **121-DS1** eine geringere Faltungspopulation im Vergleich zum nativen Foldon β -hairpin **96** auf. Da für die Ligation die Mal=Gly-Dipeptideinheit in Kombination mit einem Cystein verwendet wurde, befinden sich nach der STL zwei sehr flexible Methylengruppen innerhalb der *turn*-Struktur (vgl. Abb. 48). Hierdurch weist der β -turn eine im Vergleich stark gesteigerte intrinsische Flexibilität auf, womit die geringere Populierung des β -sheets von 53% erklärt werden kann. Bei der Untersuchung der zyklischen Hexapeptide (Kap. 3.1) konnte bereits gezeigt werden, dass die Stereodynamik und damit auch die Rigidität des Peptidrückgrates stark von der Stereokonfiguration und Anzahl der zum Succinimid-Ring in *N*- und *C*-terminaler Richtung benachbarten Stereozentren abhängt. Um die Flexibilität des *turns* weiter einzuschränken, sollte deshalb im Folgenden der Einfluss von zusätzlichen Stereozentren anstelle der flexiblen Methylengruppen zwischen der *i*+1- und *i*+2-Position sowie an der *i*+3-Position untersucht werden.

3.3.1.3 Einfluss von unnatürlichen Thioamino­säuren auf die Sekundärstruktur

In dem vorangegangenen Kapitel konnte gezeigt werden, dass durch die Ligation eines *N*-terminalen Maleimid-Peptides mit einem *C*-terminalen Cystein-Peptid, unter Bildung eines Succinimid-Thioethers an der *i*+2-Position des β -turns eines Foldon β -hairpins, eine native Faltung des β -Faltblattes mit einer Faltungspopulation von 52% erreicht werden kann. Da diese im Vergleich zu dem nativen Foldon β -hairpin mit 72% jedoch deutlich geringer ausfällt, sollte ferner der Einfluss von unnatürlichen Thioamino­säuren mit einem zusätzlichen Stereozentrum auf die Sekundärstruktur und damit einhergehend auf die Faltungspopulation untersucht werden. Hierzu wurden die bereits in Kapitel 3.1.2.1 und 3.1.2.2 beschriebenen Thiothreonin-Derivate **72** und **73** in der STL eingesetzt. Um eine weitere Rigidifizierung des Peptidrückgrates zu erreichen und somit die Stabilität der Sekundärstruktur zu erhöhen wurde als zweiter Ansatz die Synthese von 4-Mercapto-L-prolin-Derivaten ausgehend von 4(*S*)-L-Hydroxyprolin verfolgt. Werden diese Prolinderivate im Vergleich zu Cystein oder den Thiothreonin-Derivaten betrachtet, fällt auf, dass auch diese sich formal nach der Ligation innerhalb des natürlich vorkommenden Peptidrückgratregisters befinden (s. Abbildung 50).

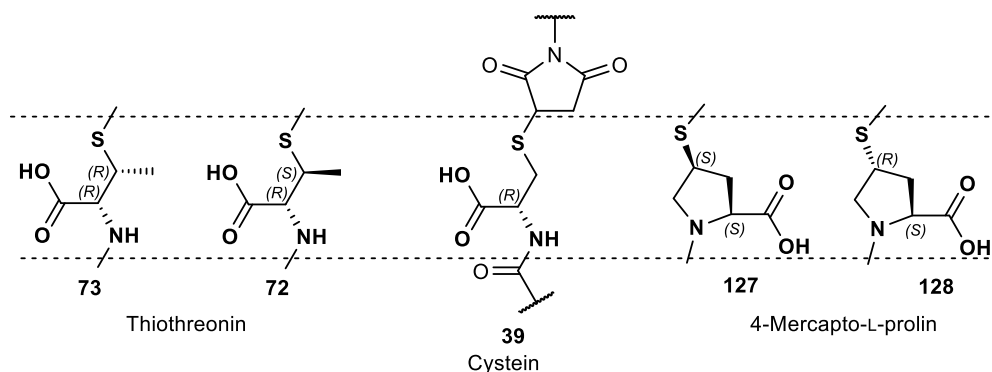


Abbildung 50: Vergleich der unnatürlichen Thioamino­säuren mit Cystein (mittig) innerhalb eines Peptidrückgrates mit Succinimid-Thioether. **Links:** die zuvor in Kapitel 3.1.2.1 und 3.12.2 beschriebenen Thiothreonin-Derivate **72** und **73**, die durch ein zusätzliches Stereozentrum in der β -Position der Aminosäureseitenkette eine weitere Stabilisierung des Peptidrückgrates bewirken können. **Rechts:** 4(*S*)- bzw. 4(*R*)-Mercapto-L-prolin (**127**, **128**) befinden sich nach der Ligation genau wie Cystein **39** ebenfalls innerhalb des natürlich vorkommenden Peptidrückgratregisters. Durch das Ringsystem des Prolins kann eine weitere, theoretische Steigerung der Rigidität ermöglicht werden.

Durch das Ringsystem des Prolins ist der konformationelle Raum deutlich stärker eingeschränkt im Vergleich zu Thiothreonin. Die Einflüsse auf die Ausbildung eines β -turns dieser unnatürlichen Thioamino­säuren und deren Einsatz in der STL werden in den folgenden beiden Kapiteln näher beleuchtet. Die dabei betrachteten Peptide sind in Tabelle 14 aufgeführt.

Tabelle 14: Zusammenfassung der ligierten Foldon β -hairpins (**129-132**) mit unnatürlichen Thioamino­säuren an der $i+1$ -Position und dem Suc=Gly-Motiv an der $i+2$ -Position des β -turns.

Nr.	N-Term	<i>i</i>	<i>i+1</i>	<i>i+2</i>	<i>i+3</i>	C-Term
129	KQAYVR	Lys	Tht	Suc	Gly	WVLLSG
130	KQAYVR	Lys	ThT	Suc	Gly	WVLLSG
131	KQAYVR	Lys	Thp	Suc	Gly	WVLLSG
132	KQAYVR	Lys	ThP	Suc	Gly	WVLLSG

3.3.1.3.1 Thiothreonin

Durch die Verwendung der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen L-Thiothreonin-Derivate **72** und **73** in der STL der Foldon β -hairpins zwischen der $i+1$ - und $i+2$ -Position, wird ein zusätzliches Stereozentrum am Peptidrückgrad innerhalb des turns eingeführt. Im Vergleich zum nativen Foldon β -hairpin befindet sich dies an der Stelle der Carbonylgruppe der zentralen Amidbindung des β -turns zwischen $i+1$ und $i+2$. Das zuvor beschriebene, ligierte Peptid **121-DS1**, mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur, besitzt an dieser Stelle eine sehr flexible Methylengruppe. Durch die zusätzliche Methylgruppe an der β -Position des Thiothreonins wird der konformative Raum um den Winkel χ eingeschränkt. Hierdurch wird eine Erhöhung der Rigidität des Peptidrückgrates erreicht. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass der Winkel χ den Diederwinkel von Aminosäureseitenketten beschreibt. Da sich im Falle der STL die Seitenkette innerhalb des Peptidrückgrates befindet, kann dieser Einfluss auf die Sekundärstruktur ausüben. Für alle anderen Aminosäuren ist für die Beschreibung des gleichen Torsionswinkels innerhalb des Peptidrückgrates der griechische Buchstabe ψ anzuwenden. Durch die Synthese des Peptides **129** mit L-*allo*-Thiothreonin an der $i+1$ -Position sollte der Einfluss auf die Ausbildung der Sekundärstruktur hin untersucht werden. Es zeigte sich, dass auch hier zwei Diastereomere im Chromatogramm der analytischen RP-HPLC voneinander unterschieden und mittels präparativer RP-HPLC getrennt werden können. Das Diastereomerenverhältnis liegt dabei wie schon bei den zuvor ligierten Peptiden **121**, **125** bei 1:1, womit ein Einfluss durch Selbstassemblierung der Peptideinzelstränge auf die Stereokonfiguration am Succinimid-Ring ausgeschlossen werden kann. Im ^1H -NMR-Spektrum zeigte sich, dass, wie schon bei Peptid **121**, nur das erste Diastereomer **129-DS1** eine zum nativen Foldon β -hairpin vergleichbare Sekundärstruktur einnimmt (s. Abbildung 51), die sich in der charakteristischen Tieffeldverschiebung der Val¹⁴- und Val²¹-Amidprotonen äußert.

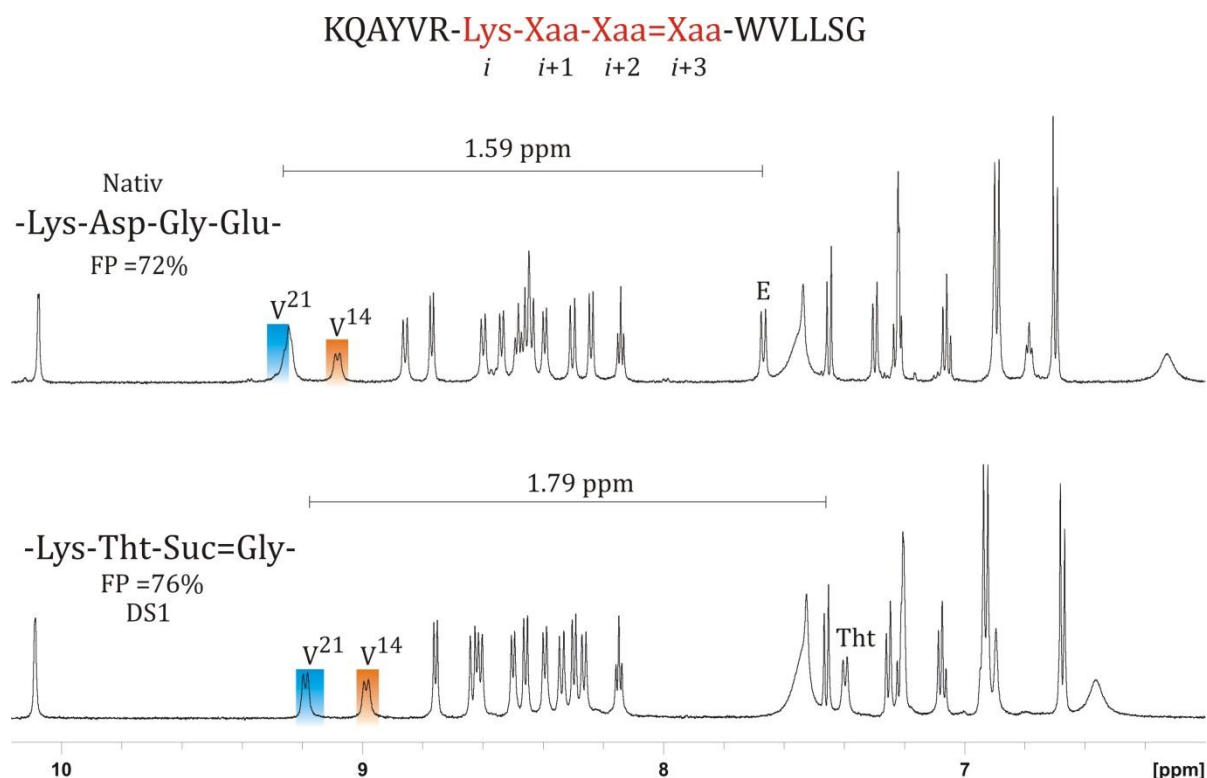


Abbildung 51: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mm Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0) im amidischen Bereich des nativen Foldon β -hairpin **96** (oben) mit dem ligierten Foldon **129-DS1** (unten).

Des Weiteren weist das ligierte Peptid **129-DS1** eine deutlich größere Dispersion der Signale im amidischen Bereich des ^1H -NMR-Spektrums im Vergleich zum nativen Foldon β -hairpin **96** auf. Dies deutet auf eine deutlich stärkere Vorzugskonformation des Peptides hin. Eine Bestimmung der Faltungspopulation aus dem TOCSY-NMR-Spektrum bestätigt diese Annahme. Durch die Einführung des (*S*)-konfigurierten Stereozentrums in Peptid **129-DS1** zwischen der *i*+1 und *i*+2-Position des *turns* konnte die Faltungspopulation im Vergleich zu dem ligierten Peptid **121-DS1** mit einer flexiblen Methylengruppe an dieser Stelle um 24% gesteigert werden. Somit weist der ligierte Foldon β -hairpin **129-DS1** mit 76% sogar eine höhere Faltungspopulation auf als der native β -hairpin **96** (vgl. Abb. 51). Um weitere Einflüsse der β -Thioamino-säure an der Lignationsstelle auf Sekundärstruktur zu beleuchten, wurde eine Konformationsanalyse durchgeführt. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Seitenkettenrotamere zum nativen Foldon β -hairpin (**96**) oder dem β -hairpin **121-DS1**.

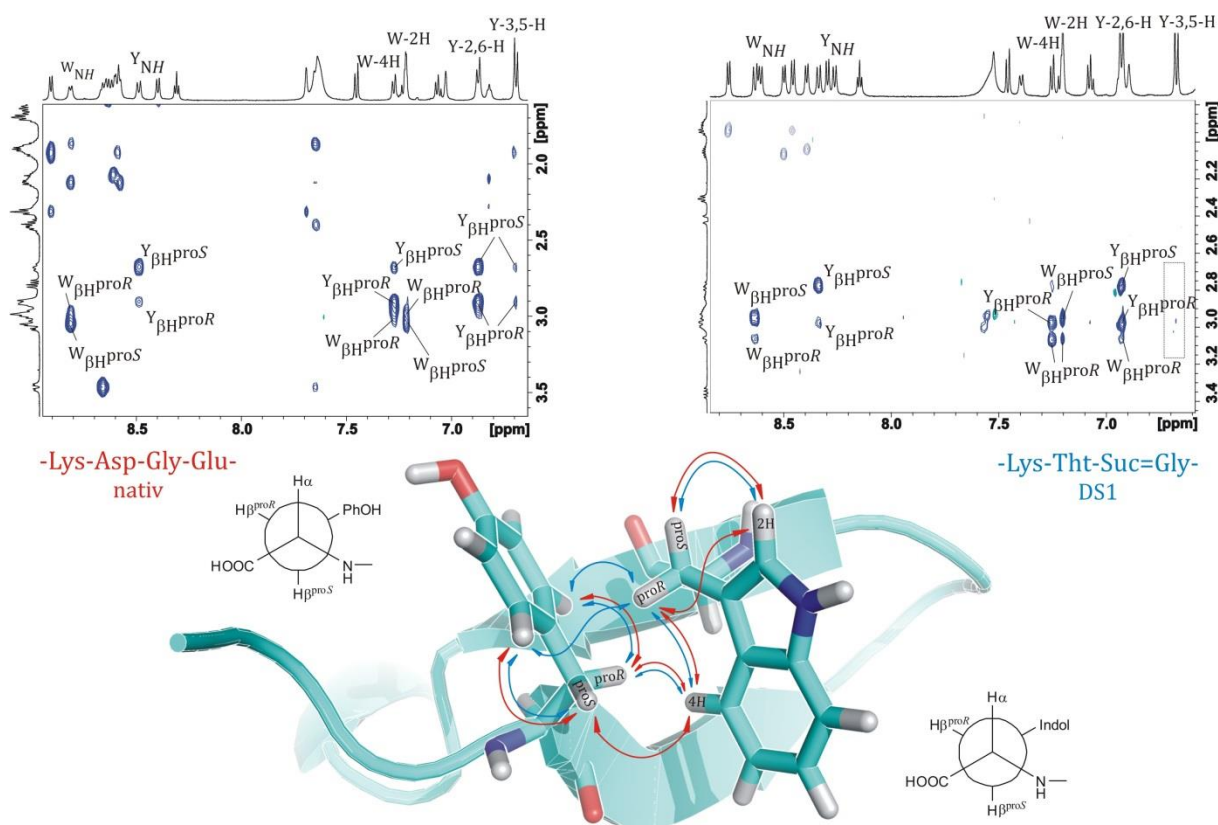


Abbildung 52: Konformationsanalyse und Vergleich der NOESY-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/D₂O (11:1), pH = 3.0, Mischzeit = 150 ms) des nativen Foldon β -hairpins **96** KQAYVR**KDGE**WVLLSG (links) mit dem ersten Diastereomer des K-Thtⁱ⁺¹- Σ G-Foldon β -hairpin **129-DS1** KQAYVR**KTht** Σ GWVLLSG (rechts) im Teilbereich des hydrophoben clusters, bestehend aus Tyr¹³ und Trp²⁰. Die Kontakte sind zur Verdeutlichung in einen Ausschnitt aus der Kristallstruktur des Foldons (PDB-Code: 1RF0) eingetragen.

Im Vergleich der NOESY-NMR-Spektren innerhalb des hydrophoben clusters zwischen Trp²⁰ und Tyr¹³ zeigten sich in Peptid **129-DS1** überraschenderweise keine Kontakte zwischen Trp-2H und Trp- β H-proR sowie Trp-4H und Tyr- β H-proS. Diese sind sowohl im nativen Foldon *hairpin 96* als auch dem ligierten Peptid **121-DS1** vorhanden. Da es sich bei den NOE-Kontakten um dipolare Kopplungen der Kerne über eine zeitlich gemittelte Konformation des Peptides handelt, folgt daraus, dass die erhöhte Rigidität des β -turns zu globalen Verringerung der β -hairpin Flexibilität führt. Weiterhin weist der hydrophobe cluster in diesem Bereich stärkere hydrophobe WW auf, wodurch die Beweglichkeit des Trp²⁰ um den Winkel χ eingeschränkt ist. Beleg hierfür ist, dass das Trp-2H des Indolrings nur einen NOE-Kontakt zu einem der beiden β -Protonen des Tryptophan aufweist (s. Abb. 52). Um weitere Informationen über die

eingeschränkte Flexibilität der Sekundärstruktur zu erlangen, wurden die Temperaturgradienten der Amidprotonen im ^1H -NMR-Spektrum bestimmt (s. Abbildung 53).

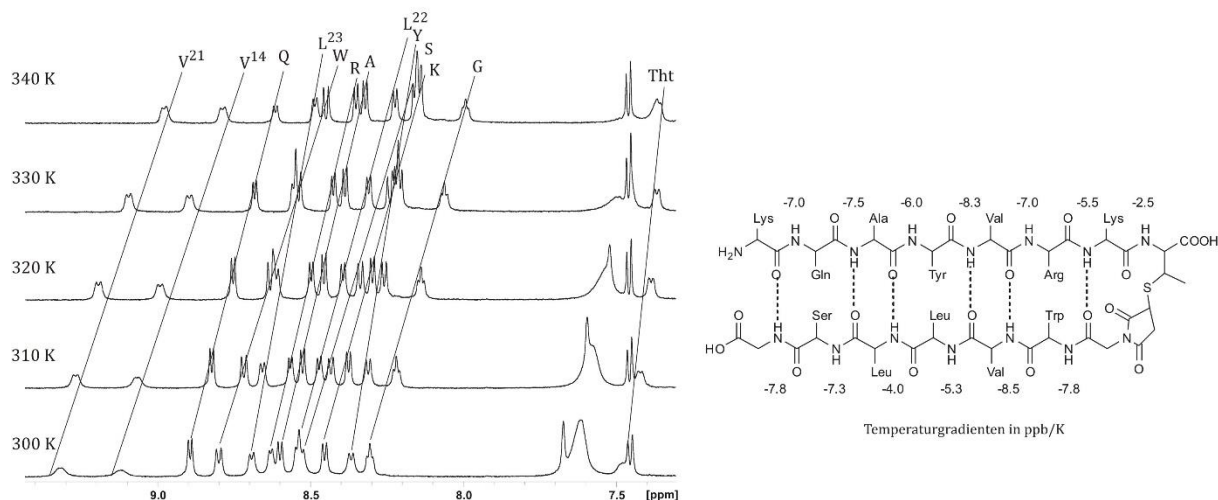


Abbildung 53: Temperaturabhängigkeit der Amidprotonen von **129-DS1** im ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0) im Bereich von 300 K bis 340 K, gemessen in 10 K Schritten.

Durch den Vergleich der Temperaturgradienten des ligierten Peptides **129-DS1** mit dem flexiblen Peptid **121-DS1** und dem nativen β -hairpin **96** (s. Tabelle 15) wird deutlich, dass die konformative Einschränkung des Peptidrückgrates an der Ligationsstelle durch das zusätzliche Stereozentrum des Thiothreonins einen weitreichenden Einfluss auf das gesamte β -sheet besitzt. Sämtliche Temperaturgradienten besitzen eine im Vergleich zum nativen Foldon β -hairpin, teils deutlich geringere Temperaturabhängigkeit. Dies deutet auf eine stärkere Abschirmung der Amidprotonen vom Lösungsmittel hin.

Tabelle 15: Vergleich der Temperaturgradienten ($\Delta\delta_{\text{NH}}/\Delta T$) der ligierten β -hairpins **121-DS1** (unten) und **129-DS1** (mitte) mit dem nativen Foldon β -hairpin **96**. Sofern nicht anders angegeben, besitzen alle Werte ein negatives Vorzeichen. Die Einheit der Temperaturgradienten ist [ppb/K].

turn	K	Q	A	Y	V ¹⁴	R	K ⁱ	X ⁱ⁺¹	X ⁱ⁺²	X ⁱ⁺³	W	V ²¹	L ²²	L ²³	S	G
KDGE	-	6.8	9.0	9.3	14.3	6.6	9.4	15.5	9.5	+1.3	10.5	17.6	10.0	9.0	7.7	7.8
KThtΣG	-	7.0	7.5	6.0	8.3	7.0	5.5	2.5	-	-	7.8	8.5	5.3	4.0	7.3	7.8
KCΣG	-	10.5	7.0	8.0	9.0	7.5	7.0	2.5	-	-	9.0	13.0	9.5	7.5	6.0	7.5

Auffällig ist dabei, dass beonders die Temperaturgradienten der Amidprotonen der Aminosäuren, die sich in einer Wasserstoffbrückenbindung befinden (A¹², V¹⁴, K¹⁶, V²¹, L²³), eine deutlich geringere Temperaturabhängigkeit im Vergleich zum nativen Foldon **96** aufweisen.

Aus dem Vergleich der NOE-Kontakte innerhalb des hydrophoben *clusters* zwischen Trp²⁰ und Tyr¹³ und dem Vergleich der Temperaturgradienten der NH-Protonen lässt sich schließen, dass die rechtsgängige Verdrillung des nativen Foldon β -*hairpins* im ligierten *hairpin* **129-DS1** erhöht ist. Diese Verdrillung ist ein maßgeblicher Faktor zur Stabilisierung der *hairpin*-Struktur und bietet eine Erklärung für die stärker abgeschirmten Amidprotonen.^[250–252] Die kompakte Struktur der gefalteten β -*hairpins* erklärt außerdem das Elutionsverhalten der Diastereomere im RP-HPLC-Chromatogramm. Durch die Ausbildung des hydrophoben *clusters* und der Wasserstoffbrückenbindung weist der Foldon *hairpin* einen amphipilen Charakter auf, der aber im Vergleich zu einer *random coil* Struktur insgesamt polarer ist.

Nachdem anhand von Peptid **129-DS1** gezeigt werden konnte, dass durch die Einführung eines zusätzlichen Stereozentrums in β -Position der zur Ligation benötigten Thioamino­säure eine deutliche Steigerung im Faltungsgrad der Sekundärstruktur erreicht werden kann, sollte weiterhin der Einfluss der Stereokonfiguration an dieser Stelle untersucht werden. Hierfür wurde die bereits in Kapitel 3.1.2.2 beschriebene Aminosäure L-Thiothreonin **73** an der *i*+1-Position zur STL des Foldon β -*hairpins* eingeführt. Im Gegensatz zur Synthese der zyklischen Hexapeptide traten unter den Standardbedingungen zur Darstellung der Peptideinzelstränge für die STL keine Nebenreaktionen des Fmoc-L-Thiothreonin-Bausteins auf. Bei der Reaktionskontrolle der STL zeigte sich, dass die beiden Diastereomere keine unterschiedlichen Retentionszeiten im RP-HPLC-Chromatogramm aufwiesen. Dies lässt bereits vermuten, dass es nicht zur Ausbildung einer Sekundärstruktur kommt. Das nach der STL isolierte Peptid **130**, konnte zweifelsfrei durch HR-MS als das gewünschte Produkt identifiziert werden. Durch die Untersuchung mittels NMR-Spektroskopie wurde jedoch die Annahme bestätigt, dass der β -*hairpin* keine native Faltung einnimmt und das Peptid als 1:1 Gemisch der beiden Diastereomere vorliegt (s. Abbildung 54).

Im TOCSY-NMR-Spektrum können im Bereich der β -Protonen des Succinimid-Ringes und der Amidprotonen des Thiothreonins beide Diastereomere differenziert werden. Jedoch weisen alle anderen Signale nahezu identische Signalsätze auf, woraus geschlossen werden kann, dass beide Diastereomere im zeitlichen Mittel eine ähnliche räumliche Konformation einnehmen. Obwohl eines der beiden Diastereomere für das Amidproton des ThT-Bausteins eine zu erwartende stärkere Hochfeldverschiebung aufweist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich in beiden Fällen um *random coil* Strukturen handelt. Auf Grund der teilweise identischen oder überlappenden Signalsätze ist eine korrekte Bestimmung der Faltungspopulation schwierig und kann für das Diastereomerengemisch nur für einen Bereich zwischen 25% und 30% angegeben werden.

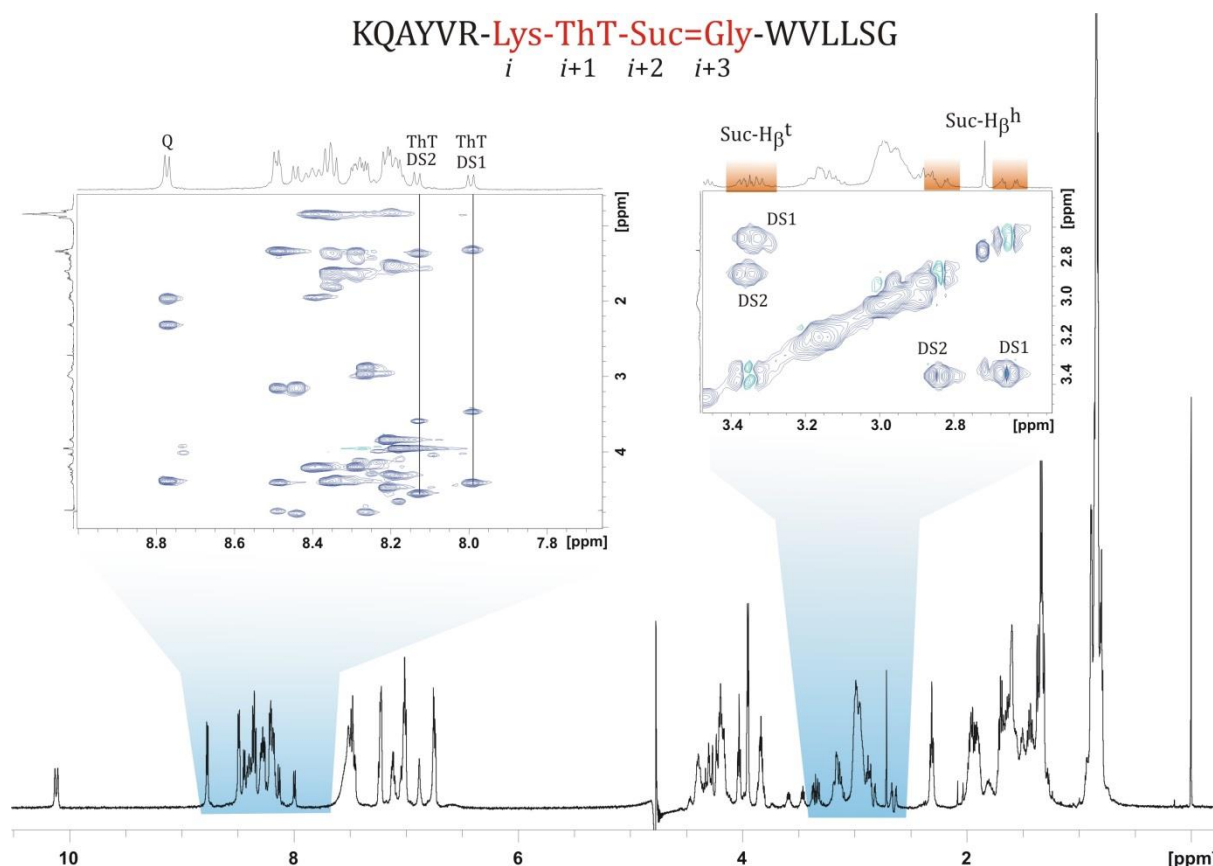


Abbildung 54: ^1H -NMR-Spektrum des Diastereomergemisches des ThT-Foldon β -hairpins **130** sowie Ausschnitte aus dem TOCSY-NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0). Nur im Bereich der β -Protonen des Succinimid-Ringes und der Amidprotonen des Thiothreonins können beide Diastereomere differenziert werden. Alle anderen Signale weisen nahezu identische Signalsätze auf, woraus geschlossen werden kann, dass beide Diastereomere im zeitlichen Mittel eine ähnliche räumliche Konformation (*random coil*) einnehmen. Die Inversion des β -Sterozentrums an der $i+1$ -Position führt zum vollständigen Verlust der Sekundärstruktur.

Dieses Ergebnis ist dennoch besonders interessant, da es zeigt, dass bereits die Änderung eines einzigen Stereozentrums am Peptidrückgrat zum vollständigen Verlust der Sekundärstruktur führen kann. Eine Erklärung für diesen Befund ist eine mögliche Orientierung der zusätzlichen Methylgruppe des L-Thiothreonins in das innere des β -turns, wodurch die Ausbildung der stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindung zwischen i und $i+3$ gestört wird.

3.3.1.3.2 4-Mercapto-L-prolin

Durch die Einführung eines zusätzlichen Stereozentrums und der damit einhergehenden Rigidifizierung des Peptidrückgrates innerhalb des β -turns der ligierten Foldon β -hairpins konnte die Faltungspopulation gesteigert werden. Basierend auf dieser Erkenntnis sollten weitere Möglichkeiten untersucht werden, den konformationellen Raum des Rückgrates im Bereich des turns einzuschränken. Da in natürlich vorkommenden Peptiden die zyklische Aminosäure Prolin solch eine Aufgabe übernimmt, fiel ein besonderes Interesse auf die am γ -Thiolsubstituierten Derivate des Prolins, dem 4-Mercaptoprolin. Im Folgenden werden zunächst die konformationellen Unterschiede zwischen Unsubstituierten- und Substituierten Prolinanaloga beleuchtet.

Die Aminosäure L-Prolin (**133**) gehört zu den nichtessentiellen proteinogenen Aminosäuren und besitzt auf Grund seiner heterocyclischen Struktur als einzige der kanonischen Aminosäuren ein sekundäres Amin. Als Konsequenz daraus ergeben sich tertiäre Amidbindungen, die mangels Wasserstoffdonor nicht in der Lage sind Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden. Die Möglichkeit als Wasserstoffbrückenakzeptor innerhalb einer Wasserstoffbrücke gebunden zu sein, besteht jedoch weiterhin.^[253] Die fünfgliedrige Ringstruktur von Prolin führt außerdem einer starken Einschränkung der möglichen Konformationen. Der Torsionswinkel ϕ kann nur Werte von $-65^\circ \pm 25^\circ$ einnehmen (vgl. Abbildung 55).^[254] Es ist seit langem bekannt, dass aufgrund dieser Alleinstellungsmerkmale Prolin eine wichtige Rolle für die Struktureigenschaften von Peptiden und Proteinen spielt. Besonders bei der Ausbildung von wie *loops*, *turns* und helikalen Strukturen wie Polyprolin Helices (PPII).^[254]

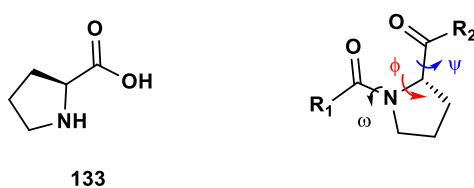
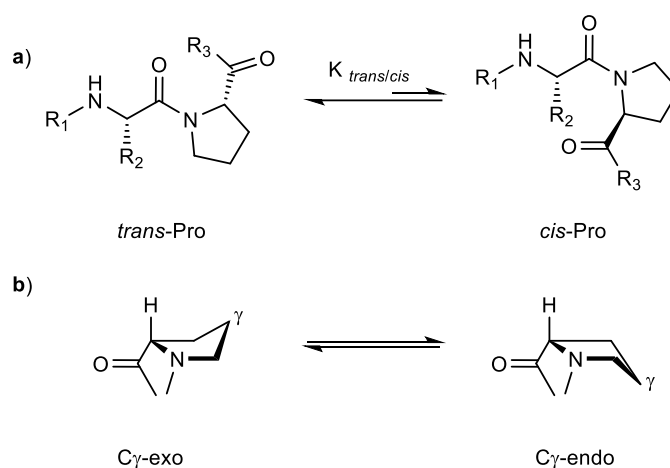


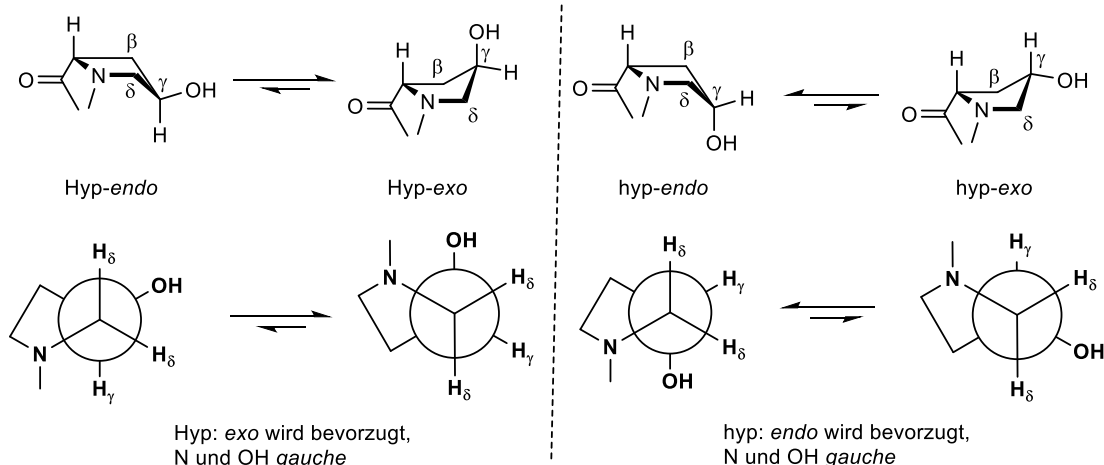
Abbildung 55: Strukturformel und Definition der Drehwinkel von L-Prolin (**133**) innerhalb eines Peptidrückgrates.^[254]

Innerhalb einer Peptidbindung besitzt Prolin verschiedene Möglichkeiten zur Konformationsänderung. So können Prolyl-Amid-Bindungen entweder *cis*- oder *trans*-konfiguriert sein, wobei in Proteinen 95% aller Amid-Bindungen in der *trans*-Konformation vorliegen. Die restlichen 5% liegen in der *cis*-Form vor.^[254] Der Wechsel zwischen *cis*- und *trans*-Form findet dabei so langsam statt, dass beide Isomere mit Hilfe der ^1H -NMR-Spektroskopie unterschieden werden können.



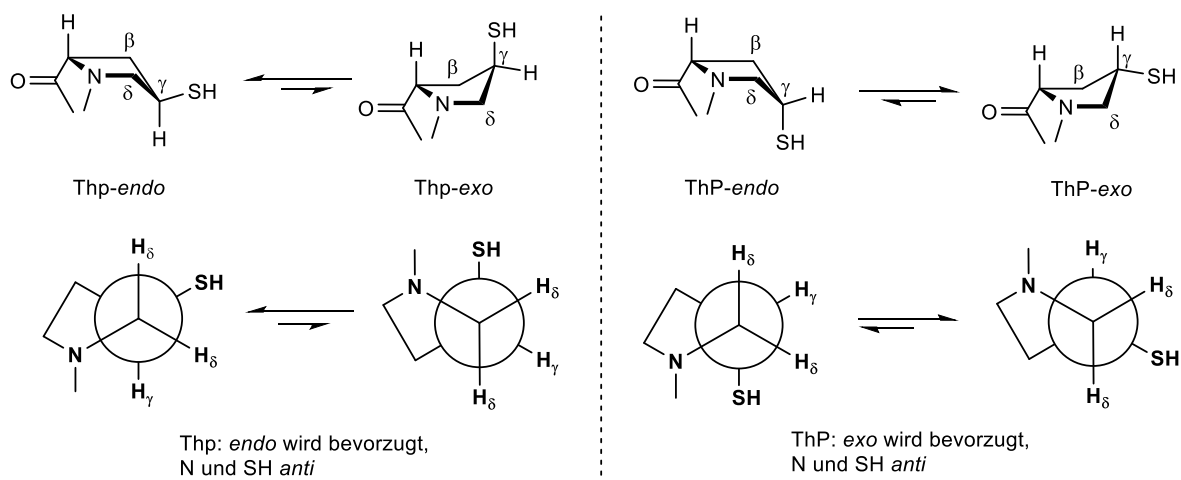
Schema 33: Konformationsgleichgewichte des Prolins. **a)** *cis-trans*-Isomerie der Prolyl-Amid-Bindung. **b)** *exo*- und *endo* Prolinpucker. Beide Konformere befinden sich in einem schnellen Gleichgewicht.^[254]

Zum anderen werden bei Prolinderivaten zwischen *exo*- und *endo*-Konformere unterschieden, beide befinden sich in einem schnellen Gleichgewicht. Die Nomenklatur bezieht sich dabei auf die Position des substituierten Kohlenstoffatoms ober- oder unterhalb der Pyrrolidinring-Ebene, in diesem Fall des C γ -Kohlenstoffatoms (s. Schema 33).^[254,255] Da die *cis-trans*-Isomerisierung der Aminoacyl-Prolin-Bindung von elementarer Bedeutung für die Faltung und Stabilität von Proteinstrukturen ist, besteht ein besonderes Interesse an Prolinanaloga, die durch gezielte Modifikation eine beliebige konformative Populationsverteilung der *cis-trans*-Prolylbindung und der *endo/exo*-Geometrie des Pyrrolidinrings zulassen.^[255,256] Hierdurch kann der Konformationsraum von Peptiden und Proteinen eingeschränkt werden und somit die thermodynamische Stabilität moduliert werden.^[255,257–259] Ein natürlich vorkommenden Beispiel hierfür ist (4*R*)-Hydroxyprolin (Hyp, **134**), welches einen großen Beitrag zur Stabilisierung der Kollagen-Tripelhelix liefert.^[254] Der Stabilisierende Effekt ist dabei zum einen auf eine *gauche*-Anordnung der 4(*R*)-Hydroxygruppe zur Amidbindung des Prolins zurückzuführen. Hierbei kommt es zu einer Überlappung des elektronenreichen $\sigma_{\text{C-H}\delta}$ -Orbitals mit dem antibindenden $\sigma^*_{\text{C-OH}}$ -Orbital. Einen weiteren Beitrag zur Stabilisierung liefert die Überlappung des $\sigma_{\text{C-H}\gamma}$ -Orbitals mit dem antibindenden Orbital des Amides $\sigma^*_{\text{C-N}}$. Diese favorisierte Überlappung führt bei (4*R*)-Hydroxyprolin zum *exo*-Puckering. Durch Inversion des Stereozentrum am C γ zum (4*S*)-Hydroxyprolin (hyp, **135**) wird hingegen die Ausbildung des *endo*-Pucker bevorzugt (s. Schema 34).



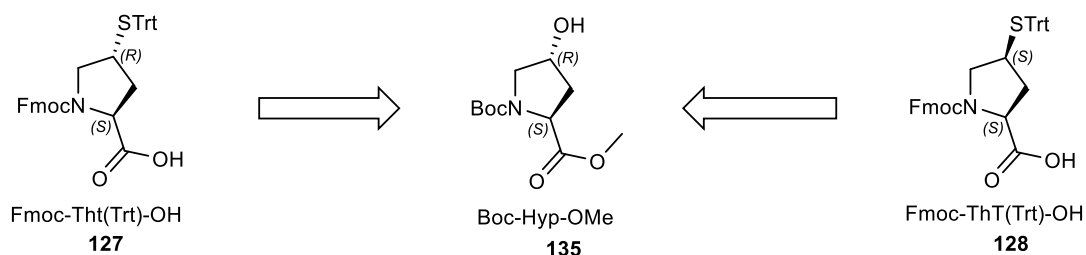
Schema 34: Bei (4*R*)-Hydroxyprolin (**134**) wird der *exo*-Pucker bevorzugt, da Hydroxygruppe und Amid in *gauche*-Position zueinander stehen. Hierbei entstehen günstige Orbitalüberlappungen, die zur Stabilisierung dieser Konformation führen. Beim (4*S*)-Diastereomer **135** wird hingegen das *endo*-Isomer bevorzugt.^[254]

Interessanterweise finden sich zum synthetischen Chalkogen-Analogon des (4*R*)-Hydroxyprolins, dem 4-Mercaptoprolin, nur wenige Anwendungsbeispiele in der Literatur.^[255,260] Ein Grund hierfür ist der sehr limitierte Zugang zu 4-Mercaptoprolin. Dennoch konnten bereits Collagen Mimetika mit Hilfe von 4-Mercaptoprolin aufgebaut die durch posttranslationale Reaktionen des Thiols modifiziert werden können.^[255] Auch in der NCL erwies sich das (4*S*)-Mercaptoprolin (ThP, **128**) als sehr effiziente Thioamino-säure.^[13] Durch den Austausch der Hydroxygruppe des Hydroxyprolins gegen eine weniger elektronegative Thiogruppe wird eine drastisch veränderte Konformationspräferenz erreicht.^[254,261,262] Verglichen mit Hydroxyprolin weist 4-Mercaptoprolin inverse Pucker auf. So bewirkt das (4*R*)-Mercaptoprolin (Thp, **127**) die Ausbildung eines *endo*-Puckers (s. Schema 35).



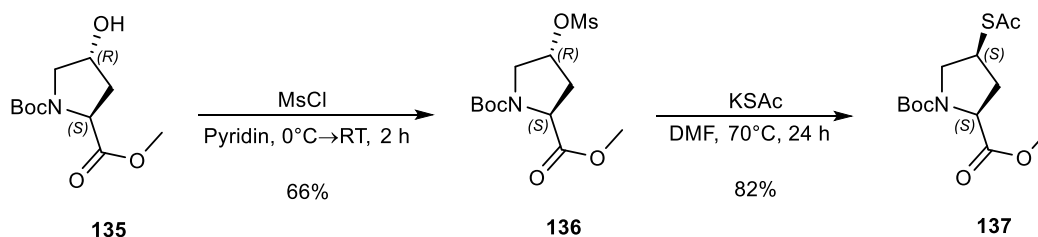
Schema 35: Bei Vorliegen eines sterisch anspruchsvollen und/oder nicht elektronenziehenden Substituenten wird die Bevorzugung der *anti*-Konformation beobachtet.^[255]

Diese Präferenz zur *endo*- und *exo*-Konformation manifestiert sich ebenfalls in der Amid *cis/trans*-Isomerie, wobei *exo*-Pucker *trans*-Amide und *endo*-Pucker *cis*-Amide stabilisieren. Die Stabilisierung des *trans*-Amides bei Vorliegen des *exo*-Puckers erfolgt über Überlappung eines freien Elektronenpaar des Prolin-Carbonyls mit dem π^* -Orbital des benachbarten Carbonyls.^[254] Dieser Effekt ist jedoch bei den Diastereomeren des 4-Mercaptoprolins deutlich schwächer ausgeprägt als bei Hydroxy- oder Fluoroprolinderivaten.^[255] Weiterhin findet (4*S*)-Mercaptoprolin **128** Anwendung in der Medizinischen Chemie als Bestandteil des ACE-Hemmers Zofenopril®. Die Grundlagenforschung zu diesem Medikament wurde von MARSHALL *et al.* vorangetrieben, der 1995 auch die erste Synthese zu beiden Diastereomeren des 4-Mercapto-L-prolin ausgehend von Hydroxyprolin vorstellte.^[263] Da zur Untersuchung der beiden 4-Mercapto-L-prolin-Derivate **127** und **128** in der STL ein synthetischer Zugang zu den jeweiligen Fmoc- und Trt-geschützten Bausteinen für den Einsatz in der SPPS erarbeitet werden sollte, dienten diese Ergebnisse zusammen mit den Arbeiten von OTAKA *et al.* sowie DONG *et al.* als Grundlage der Syntheseplanung.^[13,264] Dabei sollte ebenfalls das Boc- und Methylester-geschützte Derivat des (4*R*)-Hydroxyprolin **134** als Startmaterial für beide Synthesen sein (s. Schema 36).



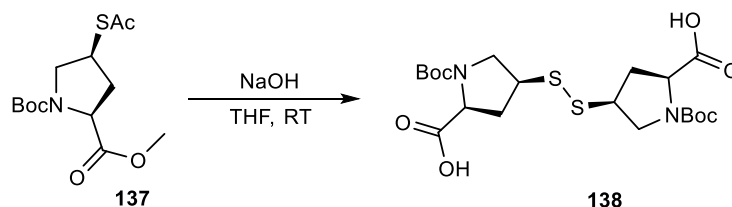
Schema 36: Darstellung der SPPS-kompatiblen 4-Mercapto-L-prolin-Derivate **127** und **128** ausgehend von Boc-(4*R*)-Hydroxyprolinmethylester **135**.

Durch die bereits in dieser Arbeit gesammelten Erfahrungen in den Synthesen zur Darstellung der beiden Thiothreonin-Diastereomere **72** und **73** (s. Kap. 3.1.2) konnte auch die Literaturbekannte Synthese zur Darstellung des Fmoc- und Trt-geschützten (4*S*)-Mercaptoprolin von DONG *et al.*^[13] durch eine Änderung in der Schutzgruppenstrategie kosteneffizienter gestaltet und im Falle des (4*R*)-Mercaptoprolins, die erste bekannte Synthese eines SPPS kompatiblen Bausteins etabliert werden. Die einzelnen Stufen der Synthese werden im Folgenden kurz erläutert. Zur Darstellung des (4*S*)-Mercaptoprolin-Derivates **128** wurde ausgehend von Boc-Hyp-OMe **135** die Hydroxygruppe durch Aktivierung mit Methansulfonsäurechlorid in Pyridin und anschließender Inversion des Stereozentrums in einer S_N2 -Reaktion mit Kaliumthioacetat als Nukleophil mit 82% Ausbeute in das vollständig geschützte Mercaptoprolin-Derivat **137** überführt werden (s. Schema 37).



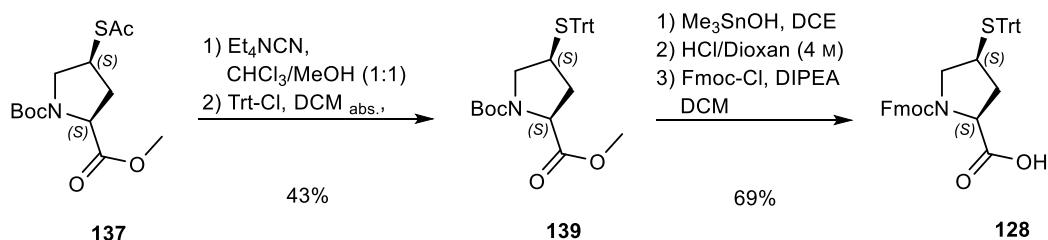
Schema 37: Aktivierung des Alkohols **135** mit Methansulfonsäurechlorid und anschließende Stereoinversion des Mesylats **136** durch den nukleophilen Angriff von Thioacetat in einer $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion unter Ausbildung des vollständig geschützten Mercaptoprolin-Derivates **137**.

Im nächsten Schritt der Synthese sollte eine zeitgleiche Verseifung des Thioacetates und des Methylesters von **137** erfolgen. Jedoch konnte nach der Reaktion mit einer 1 M NaOH-Lösung in THF als Lösungsmittel nur das Disulfid **138** isoliert werden. Auch durch entgasen des Lösungsmittels und arbeiten unter Inertgas konnte diese Nebenreaktion nicht unterdrückt werden.



Schema 38: Die Verseifung des Thioacetates und des Methylesters von **137** mit NaOH in THF führt zur Ausbildung des Disulfids **138**.

Eine Spaltung des Disulfids **138** mit TCEP als Reduktionsmittel führte ebenfalls nicht zum gewünschten Produkt. Daher wurde erst selektiv das Thioacetat **137** mit Tetrabutylammoniumcyanid gespalten (vgl. Schema 27). Das freie Thiol wurde ohne weitere Aufreinigung unter Schutzgas in wasserfreiem DCM gelöst und mit Tritylchlorid versetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte das Trityl-geschützte Mercaptoprolinderivat **139** in 43% Ausbeute erhalten werden.



Schema 39: Einführung der SPPS kompatiblen Schutzgruppen durch selektive Spaltung des Thioacetates **137** mit Et_4NCN und anschließender Umsetzung des freien Thiols mit Trt-Cl. Verseifung des Methylesters **139** mit Me_3SnOH und anschließende selektive Boc-Entschützung mit HCl in Dioxan gefolgt von der finalen Fmoc-Schützung mit Fmoc-Cl.

Die Verifizierung des Enantiomerenüberschusses nach der Stereoinversion wurde, da es sich um Diastereomere handelt, mittels ^1H -NMR-Spektroskopie anhand von Verbindung **139** überprüft. Da bei Raumtemperatur nicht nur die beiden möglichen Diastereomere sondern auch die bereits eingangs erwähnte *cis-trans*-Isomere des Carbamates der Boc-Schutzgruppe im ^1H -NMR-Spektrum zwei Signalsätze ergeben kann, wurde eine Temperaturreihe von 300 K bis 360 K aufgenommen. Hierdurch wird das Gleichgewicht der *cis-trans*-Isomerie vollständig auf die Seite des *trans*-Amids verschoben. Ab einer Temperatur von 340 K wird somit nur noch ein Signalsatz für jedes Diastereomer beobachtet. In Abbildung 56 ist zu erkennen, dass oberhalb von 340 K nur noch ein Signalsatz auftritt. Damit handelt es sich bei Verbindung **139** um eine Diastereomerenreine Substanz mit einem *d.r.* > 99%. Zusätzlich konnte von diesem Derivat ein Einkristall erhalten werden. Die Röntgenkristallstrukturanalyse bestätigt die korrekte Stereokonfiguration des C_γ -Stereo-Zentrums (s. Abbildung 56).

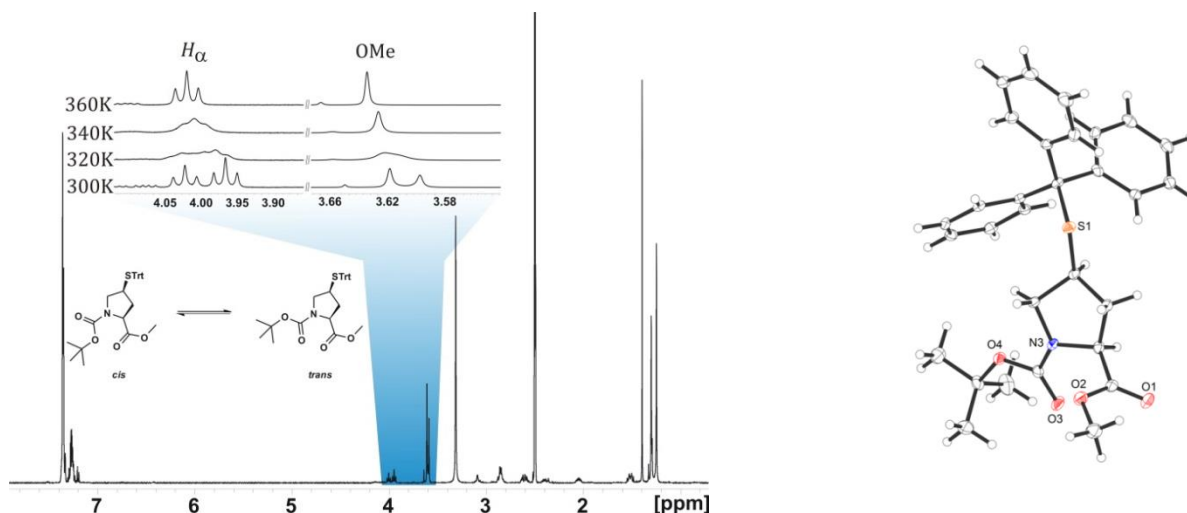
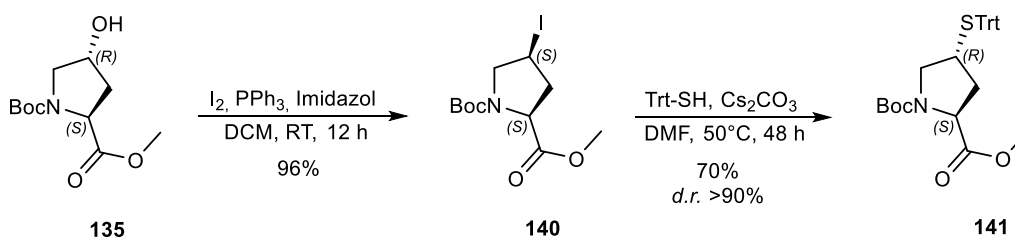


Abbildung 56: links: ^1H -NMR-Spektren (500 MHz, 300 K–360 K, $\text{DMSO}-d_6$) des vollständig geschützten Mercaptoprolin-Derivates **139**. Oberhalb von 340 K wird nur noch ein Signalsatz beobachtet, womit bestätigt wird, dass es sich um eine Diastereomerenreine Verbindung handelt. rechts: Die Röntgenkristallstrukturanalyse von **139** bestätigt die korrekte Stereokonfiguration am C_γ .

Zur Verseifung des Methylesters des vollständig geschützten Mercaptoprolin-Derivates **139** wurde Trimethylzinnhydroxid eingesetzt. Das gewünschte Produkt mit der freien Carbonsäure konnte nach Extraktion in quantitativen Ausbeuten als gelber Feststoff erhalten werden. Folgende Untersuchungen zeigten, dass diese Reaktion auch mit einer 1 M Lithiumhydroxid-Lösung in THF erfolgreich durchgeführt werden kann. Dies stellt eine deutlich kostengünstigere alternative dar und sollte in diesem Fall dem äußerst toxischen Me_3SnOH als Reagenz vorgezogen werden. Zur Einführung der finalen Fmoc-Schutzgruppe wurde zunächst die Boc-Schutzgruppe selektiv in Gegenwart der ebenfalls säurelabilen Tritylschutzgruppe mit einer 4 M HCl in Dioxan-Lösung

abgespalten. Das so quantitativ erhaltene freie Amin wurde dann unter Schutzgas in wasserfreiem DCM mit Fmoc-Chlorid umgesetzt. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte die Zielverbindung *N*-Fmoc-(4*S*)-thiotrityl-L-Prolin **128** in einer Gesamtausbeute von 16% über sieben Stufen als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten werden. Dieser ist ohne Einschränkungen in der SPPS einsetzbar, sowie bei Raumtemperatur stabil und lagerbar.

Die Synthese des diastereomeren *N*-Fmoc-(4*R*)-thiotrityl-L-Prolin **127** wurde ebenfalls ausgehend von Boc-Hyp-OMe **135** begonnen. Als Schlüsselschritt der Synthese wurde analog zur Synthese des Fmoc-L-Thiothreonins **73** eine doppelte Stereo-inversion am C γ durchgeführt. Hierzu wurde der Alkohol **135** in einer APPEL-Reaktion mit elementarem Iod in das Iodid **140** überführt. Dieses konnte in 96% Ausbeute erhalten werden, der auch über längere Zeit bei Raumtemperatur ohne Schutzgas stabil blieb und gelagert werden konnte. Da in der vorangegangenen Synthese des (4*S*)-Mercapto-L-prolins die Einführung der Tritylschutzgruppe nur mit mäßigen Ausbeuten realisiert werden konnte, wurde hier die Reaktionsführung geändert. Geplant war die direkte Einführung des Trityl-geschützten Schwefels in einer S_N2-Reaktion an dem Iodid **140**. Durch die Verwendung von Triphenylmethylmercaptan unter der Zugabe von Cäsiumcarbonat als Base, konnte in dieser Reaktion mit einer Ausbeute von 70% das gewünschte Produkt **141** isoliert werden (s. Schema 40). Hierdurch können zwei Stufen gespart werden und ersparen einen unnötigen Austausch der Schutzgruppen. Versuche diese Reaktionsbedingungen auf das Mesylat **136** zu übertragen schlugen hingegen jedoch fehl.



Schema 40: Schlüsselschritt der Synthese von *N*-Fmoc-4(*R*)-thiotrityl-L-Prolin **127**. Die doppelte Stereo-inversion am γ -Kohlenstoffatom zur Einführung des Thiols wurde durch eine APPEL-Reaktion mit elementarem Iod und anschließender S_N2-Reaktion des Iodids **140** mit Triphenylmethylmercaptan als Nukleophil in Gegenwart von Cäsiumcarbonat hin zum Mercaptoprolin-Derivat **141** erreicht.

Der Diastereomenüberschuss des Trityl-geschützte Mercaptoprolinderivat **141** wurde wie zuvor beschrieben mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bestimmt (s. Abbildung 57). Bei 360 K ist im Bereich des H $_{\alpha}$ ein zweiter Signalsatz zu erkennen, der eindeutig dem (4*S*)-Mercapto-L-prolin-Diastereomer **139** zugeordnet werden kann. Über das Integralverhältnis ergibt sich somit einen *d.r* von >90%. Grund

für das Auftreten des falschen Diastereomers liegt in der langen Reaktionszeit bei der

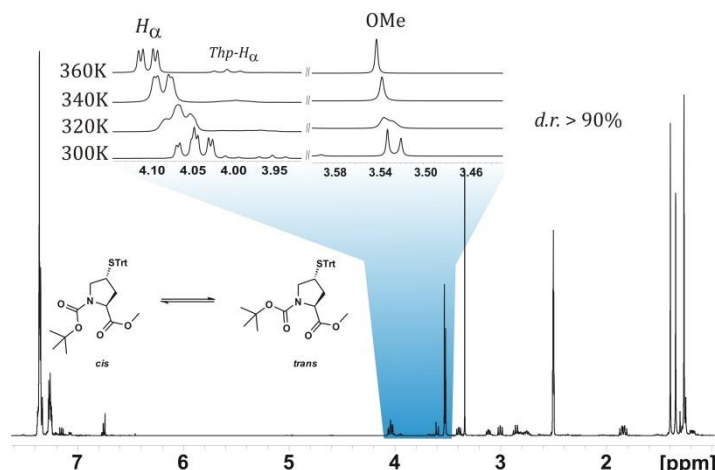
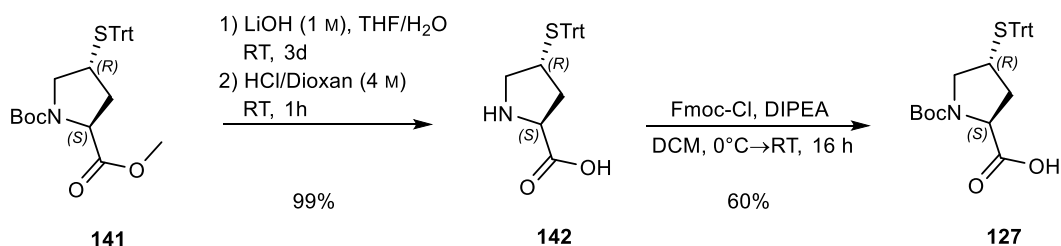


Abb. 57: ^1H -NMR-Spektren (500 MHz, 300 K-360 K, $\text{DMSO}-d_6$) des (4*R*)-Mercapto-L-prolin-Derivates **141**. Bei 360K wird zusätzlich ein Signalsatz des (4*S*)-Mercapto-L-prolin-Derivates **139** mit einem Integralverhältnis von 10:1 beobachtet.

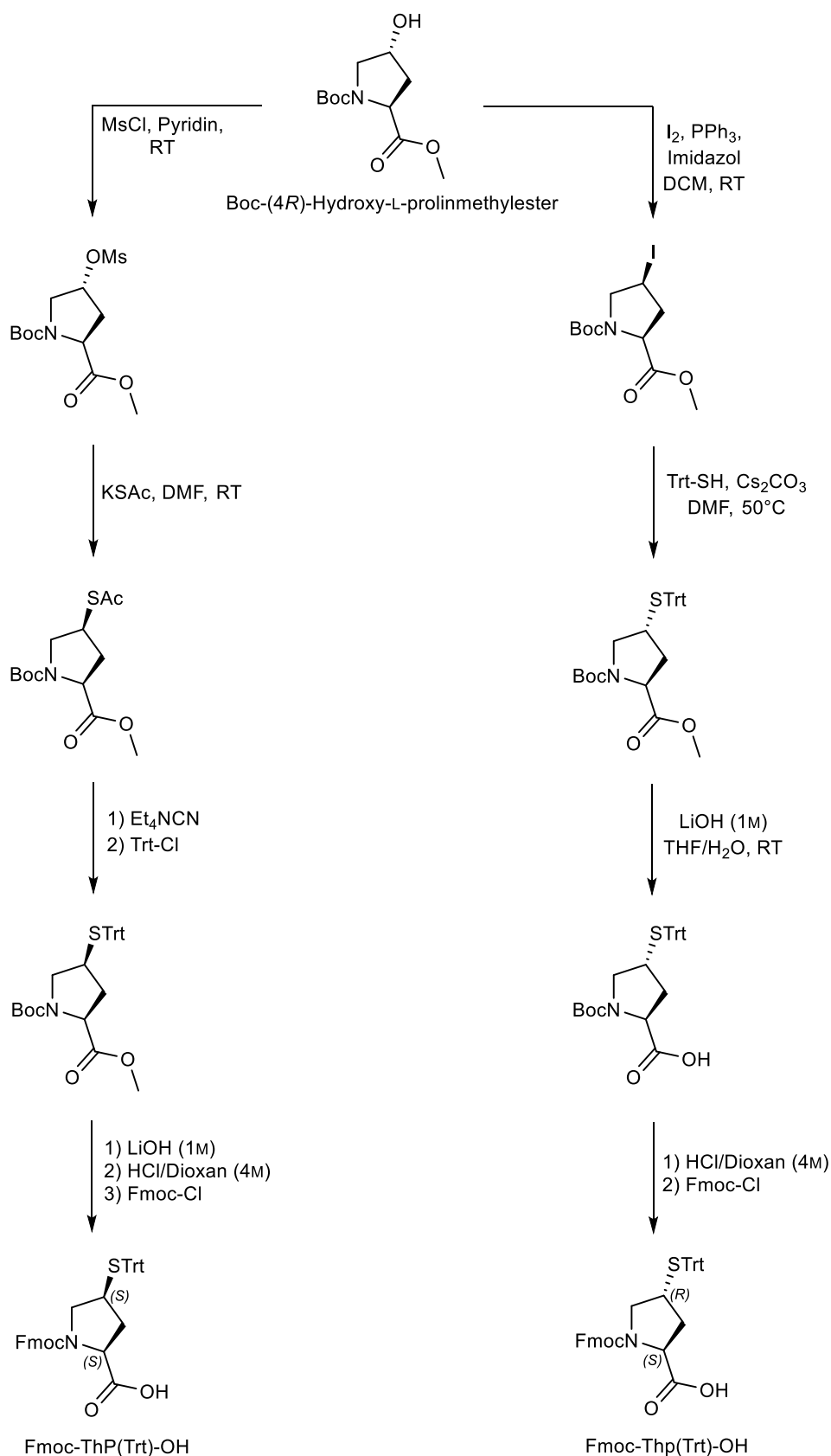
Einführung des Thiols. Bei einer Verringerung der Reaktionszeit auf 24 Stunden wurde jedoch ein starker Einbruch bei den Ausbeuten beobachtet. Der Methylester **141** konnte in Gegenwart einer 1 M Lithiumhydroxid-Lösung quantitativ verseift werden. Das Produkt wurde ohne weitere Aufreinigung mit einer 4 M HCl in Dioxan-Lösung, zur selektiven Entschützung der Boc-Schutzgruppe, umgesetzt. Auch hier konnte das freie Amin **142** in

quantitativen Ausbeuten erhalten werden. Dieses wurde dann unter Schutzgas in der finalen Fmoc-Schützung mit Fmoc-Cl in wasserfreiem DCM eingesetzt (s. Schema 41).



Schema 41: Verseifung des Methylesters **141** mit einer 1 M Lithiumhydroxid-Lösung und anschließende selektive Boc-Entschützung mit einer 4 M HCl in Dioxan-Lösung. Anschließend erfolgt die Einführung der SPPS kompatiblen Fmoc-Schutzgruppen unter Inertgas mit Fmoc-Cl in wasserfreiem DCM unter Erhalt der Zielverbindung **127**.

Nach säulenchromatographischer Aufreinigung konnte die Zielverbindung Fmoc-(4*R*)-thiotrityl-L-Proline **127** in einer Gesamtausbeute von 40% über fünf Stufen als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten werden. Diese hier vorgestellte Syntheseroute, ist die erste mit kostengünstigen Chemikalien und durch die Einführung der Tritylschutzgruppe über eine $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit Triphenylmethylmercaptan können im Vergleich zwei Stufen gespart werden. Außerdem beinhaltet die Synthese nur drei säulenchromatographische Aufreinigungen und ein *upscaling* ist für jede Stufe problemlos durchführbar, womit diese Route einen interessanten großtechnischen Zugang zu diesem Diastereomer liefert. In Schema 42 sind noch einmal alle Stufen zur Synthese der 4-Mercaptoproline-Derivate **127** und **128** zusammengefasst dargestellt.



Schema 42: Zusammenfassendes Reaktionsschema aller Stufen der beiden Synthesen von Fmoc-(4*S*)-Thiotrityl-L-Prolin **128** und Fmoc-(4*R*)-Thiotrityl-L-Prolin **127** ausgehend von Boc-(4*R*)-Hydroxy-L-prolinmethylester **135**.

Nachdem beide 4-Mercapto-L-prolinderivate **127** und **128** als SPPS-kompatible Bausteine erfolgreich synthetisiert werden konnte, wurde diese in der STL eingesetzt. Wie in den vorangegangenen Kapiteln sollte auch hier der konformationelle Einfluss der Thioamino-säure in der *i*+1-Position des Foldon β -hairpins untersucht werden. Bei der Ligation des Thp-Foldons **131** als auch dem ThP-Foldon **132** (s. Tabelle 14) konnten in beiden Fällen die möglichen Diastereomere mittels präparativer RP-HPLC voneinander getrennt werden. Ein besonderes Interesse galt dabei dem jeweils ersten, polareren Diastereomer (DS1). Die Auswertung des ^1H -NMR-Spektrums zeigte bei beiden Verbindungen eine relativ hohe Dispersion der Signale im amidischen Bereich (s. Abbildung 58). Da jedoch weder ein Amidproton an der *i*+1 noch an der *i*+3-Position vorzufinden sind und dadurch kein Amidsignal im Hochfeld zu erwarten ist, kann über die Größe der Signaldispersion keine Aussage über das Vorhandensein einer ausgeprägten Sekundärstruktur getroffen werden. Einen ersten Hinweis für eine Vorzugskonformation der beiden Peptide **131-DS1** und **132-DS1** liefert die diastereotope Aufspaltung der beiden H_α -Protonen des Suc=Gly-Bausteins. Diese tritt nur auf, wenn sich der Succinimid-Ring in einer konformativ eingeschränkten Umgebung befindet.

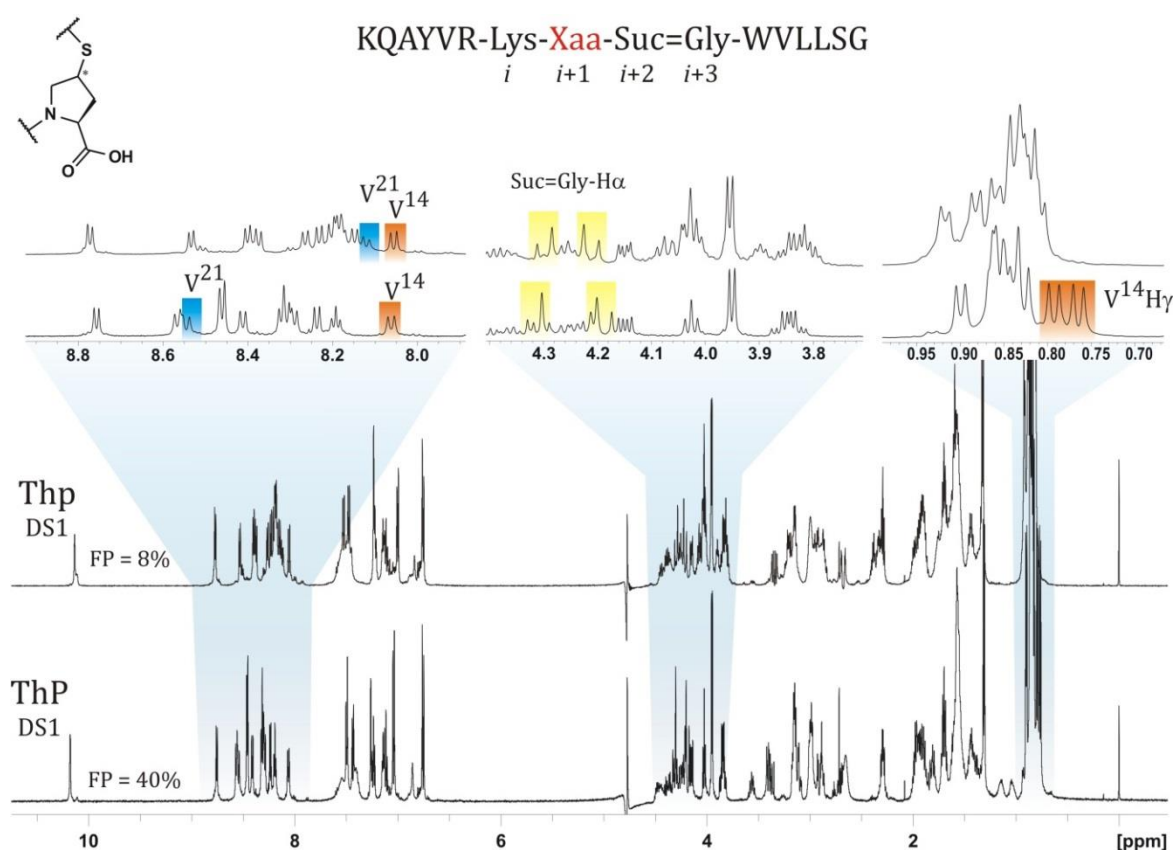


Abbildung 58: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0) der jeweils ersten Diastereomere der ligierten Mercaptoprolin Foldon β -hairpins **131-DS1** (Thp) und **132-DS1** (ThP). Diastereotope Aufspaltung der markierten Signale sowie die Faltungspopulation von 40% deuten bei **132-DS1** (unten) auf die Ausbildung einer Sekundärstruktur hin.

Im Vergleich hierzu zeigen die jeweils zweiten Diastereomere **131-DS2** und **132-DS2** an dieser Position keine diastereotopie Aufspaltung und lediglich ein Singulett als Signal. Überraschend hingegen ist das Ergebnis der Faltungspopulationen. Im Falle des ligierten, Thp (4*R*) beinhaltenden Foldon *hairpins* **131-DS1** beträgt diese nur 8%, was auf eine *random coil* Struktur des Peptides mit Tendenz zur Ausbildung einer Helix hindeutet. Im Einklang mit diesem Befund steht auch die starke Hochfeldverschiebung der beiden Valin-Amidprotonen (vgl. Abb. 58), die darauf hindeutet, dass sich die beiden Reste in einer helikalen Umgebung befinden. Im Kontrast dazu weist das ThP-Peptid **132-DS1** eine Faltungspopulation von 40% auf. Bemerkenswert dabei ist, dass durch die Auswertung des NOESY-Spektrums belegt werden konnte, dass der *hydrophobe cluster* zwischen Tyr¹³ und Trp²⁰ nicht Ausgebildet wird. Weiterhin weist das Amidproton des Val²¹ eine für Foldon β -*hairpins* zu erwartende Tieffeldverschiebung auf, wohingegen Val¹⁴ eine ungewöhnlich große Hochfeldverschiebung aufweist. Weitere Auswertungen der NMR-Daten zeigten, dass sich Val¹⁴ in einem hydrophoben Kontakt mit dem

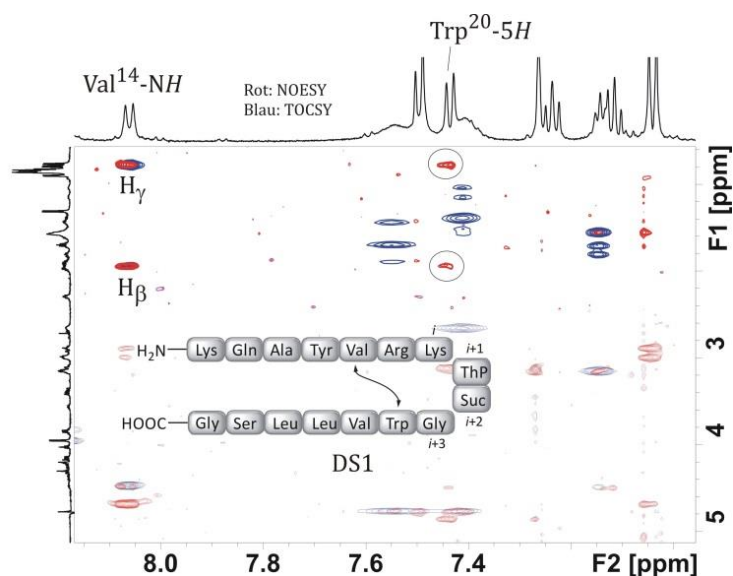


Abbildung 59: Überlagerung von TOCSY- und NOESY-NMR (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/D₂O (11:1), pH = 3.0). Die Interstrang NOE-Kontakte zwischen Val¹⁴ und Trp²⁰ (mit Kreisen markiert) sind ein Indiz für die Ausbildung einer β -turn ähnlichen Sekundärstruktur des Peptides **132-DS1**.

β -turn ähnliche Struktur innerhalb der primärsequenz des Foldon β -*hairpins* induziert werden kann, die durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen Val¹⁴ und Trp²⁰ stabilisiert wird. Diese unterscheidet sich jedoch deutlich vom nativen Foldon β -*hairpin* **96** sowie von den in den vorangegangenen Kapitel beschriebenen ligierten Foldon β -*hairpins* **121-DS1** und **129-DS1**.

gegenüberliegenden Indolring des Trp²⁰ befindet. Hinweis hierfür sind NOE-Kontakte zwischen dem Trp²⁰-5H und den Val¹⁴-H _{β} sowie Val¹⁴-H _{γ} Protonen (s. Abbildung 59). Diese hydrophoben Wechselwirkungen bieten außerdem eine gute Erklärung für die diastereotopie Aufspaltung der Protonen der Val¹⁴- γ -CH₃ (s. Abbildung 58) mit der einhergehenden Hochfeldverschiebung. Zusammenfassend lässt sich daraus folgern, dass durch die Ausbildung eines Succinimid-Thioethers mit (4*S*)-Mercapto-L-prolin **128** als Thioamino-säure eine

Werden nun die Ergebniss des Kapitels 3.3.1.3 rückblickend betrachtet, zeigt sich, dass die Wahl der zur Ligation notwendigen Thioamino­säure sowie deren Stereo­konfiguration einen sehr starken Einfluss auf die Ausbildung einer Sekundärstruktur besitzen. Im Falle der Thiothreonin Peptide **129** und **130** konnte eindrucksvoll bewiesen werden dass die Stereo­konfiguration eines einzigen Stereo­zentrums darüber entscheidet, ob eine Faltungspopulation größer der evolutionär optimierten und natürlich vorkommenden ist (**129-DS1**) oder eine *random coil* Struktur der Peptide (**130**) vorliegt.

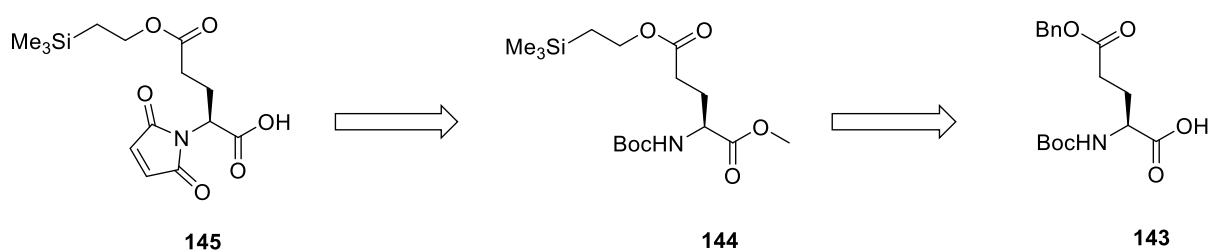
In der Succinimid-Thioether-Ligation der Foldon β -*hairpins* durch Einführen der konformativ eingeschränkten 4-Mercaptoprolin-Derivate konnte keine Faltung der nativen Sekundärstruktur unter Ausbildung des *hydrophoben clusters* beobachtet werden. Jedoch zeigte das Peptid **132-DS1** mit dem (4S)-Mercapto-L-prolin an der *i*+1-Position eine starke Vorzugskonformation, die sich in einer starke diastereotopen Aufspaltung des Suc=Gly-H $_{\alpha}$ sowie den Val¹⁴-H $_{\gamma}$ äußert. Die zugrundeliegende Struktur konnte anhand der analytischen Daten nicht zweifelsfrei aufgeklärt werden. Aus der Bestimmung der Faltungspopulation und der Analyse der NOE-Kontakte scheint aber eine Tendenz zur Ausbildung einer *hairpin*-ähnlichen Struktur vorzuliegen.

Weiterhin bietet insbesondere das synthetisch besser zugängliche (4R)-Mercapto-L-prolin (Thp, **127**) eine interessante Möglichkeit um β -*hairpins* durch Einführen eines D-Phe-Thp-Motivs an der *i*+1 und *i*+2-Position des β -turns zu Stabilisieren. Die dadurch im *turn* befindliche Thiolgruppe des Thp, die eine leicht zugängliche Position einnimmt, ermöglicht eine Vielzahl von posttranslationalen Modifikationen. Erste Synthesen solcher Verbindungen sowie Experimente zu dieser Thematik werden in Kapitel 3.5 behandelt.

3.3.1.4 Synthese und Struktureinfluss von chiralen Maleimid-Dipeptidbausteinen

3.3.1.4.1 Maleimid-Glutaminsäure-Dipeptidbaustein (Mal=Glu)

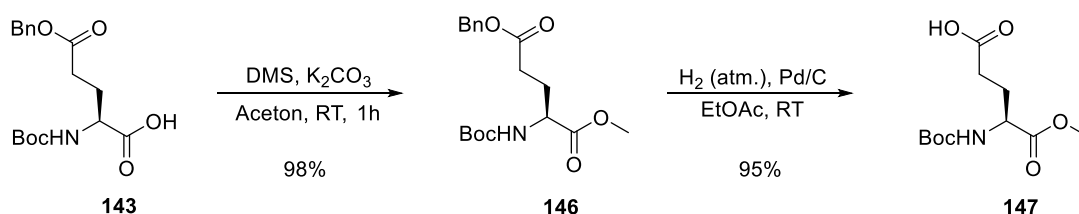
Durch den Einsatz des Mal=Gly-Dipeptidbausteins **61** in der STL zum Aufbau des Foldon β -hairpins wie sie in den vorherigen Kapiteln zur Synthese der Peptide **119-126** und **129-132** beschrieben wurde, befindet sich neben dem Succinimid-Ring an der *i*+2-Position ein Glycin-Rest an der *i*+3 Position. Hierdurch wird die natürlich vorkommende Glutaminsäure-Seitenkette an dieser Stelle durch eine flexible Methylengruppe ersetzt. Um den Verlust der funktionellen Gruppe in der Seitenkette an dieser Position zu vermeiden wurde eine Synthesestrategie zur Darstellung eines SPPS-kompatiblen Mal=Glu-Dipeptidbausteins ausgehend von Glutaminsäure erarbeitet. Als besondere Herausforderung besteht hierbei die orthogonale Schützung und selektive Adressierung der beiden Carboxylgruppen der Glutaminsäure. Um dieses Syntheseproblem zu minimieren, wurde als Startmaterial die kommerziell verfügbare, *N*-terminal Boc- und in der Seitenkette Benzyl-geschützte, Glutaminsäure (Boc-Glu(OBn)-OH, **143**) gewählt (~3€/g). Da der Benzylester in der Seitenkette nur hydrogenolytisch gespalten werden kann, eignet sich dieser nicht für die Synthese eines Maleimid-Dipeptidbausteins, da bei der Entschützung auch die Maleimid-Doppelbindung reduziert würde. Aus diesem Grund wurde für die Carboxylgruppe in der Seitenkette die von SIEBER *et al.* erstmals für die Synthese von Aminosäurebausteinen beschriebene TMSE-Schutzgruppe (2-(Trimethylsilyl)-Ethyl) als finale Schutzgruppe gewählt (s. Schema 43).^[265] Diese ist unter den folgenden Reaktionsbedingungen der Syntheseroute stabil und kann orthogonal mit allen anderen Schutzgruppen nach erfolgter SPPS (Fmoc/*t*Bu-Strategie) im sauren mit TFA oder selektiv durch die Zugabe von TBAF quantitativ abgespalten werden.^[265]



Schema 43: Retrosynthese des Mal=Glu(OTMSE)-Dipeptidbausteins **145** ausgehend von Boc-Glu(OBn)-OH **143**.

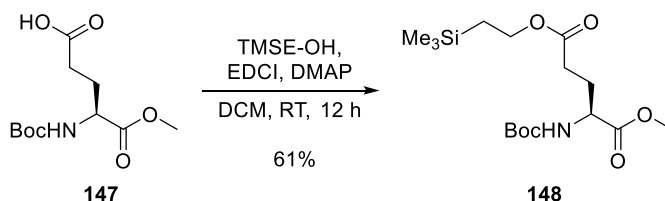
Im ersten Schritt der Synthese wurde die freie α -Carbonsäure des Eduktes **143** in einer Veresterung mit Dimethylsulfat (DMS) und Kaliumcarbonat in Aceton in den Methylester **146** überführt. Hierbei greift das Carboxylat nukleophil die Methylgruppe des Dimethylsulfats an. Nach der Abspaltung eines Sulfations wird der Methylester **146** erhalten. Nach der wässrigen

Aufarbeitung konnte der Methylester **146** in 98% Ausbeute erhalten werden. Eine Veresterung mit Acetylchlorid in Methanol, analog zu Kap 3.1.2.2, führte zu einer Umesterung in der Seitenkette unter Erhalt des zweifachen Methylesters, womit diese Reaktionsbedingungen nicht geeignet waren. Zur Einführung der TMSE-Schutzgruppe wurde zunächst der Benzylester in der Seitenkette von **146** hydrogenolytisch in einer heterogenen Katalyse mit Paladium auf Kohle bei Atmosphärendruck gespalten um die freie Carboxylgruppe **147** in der Seitenkette zu erhalten. Auch bei dieser Reaktion ist die richtige Lösungsmittelwahl entscheidend. Klassischerweise wurden alle vorherigen Reduktionen mit Wasserstoff und Pd/C in Methanol bei RT durchgeführt. Diese Reaktionsbedingungen führten jedoch in diesem Fall ebenfalls, wie in der vorangegangenen Veresterung mit Acetylchlorid, zu einer Umesterung, wodurch wieder der zweifache Methylester erhalten wurde. Durch die Substitution von Methanol als Lösungsmittel gegen Essigsäureethylester konnte das gewünschte Produkt **147** ohne Nebenreaktion in 95% Ausbeute erhalten werden (s. Schema 44).



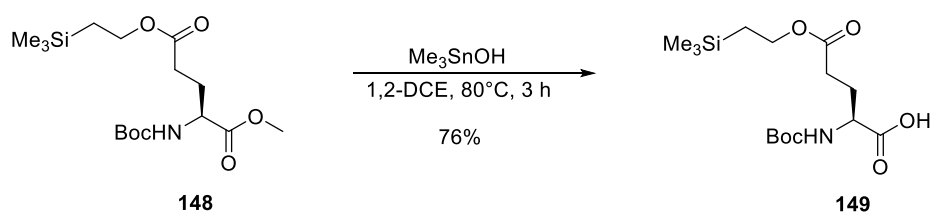
Schema 44: Einführung der C-terminalen Schutzgruppe und Freisetzung der Seitenkettenfunktionalität. Die Veresterung des Eduktes **143** mit Dimethylsulfat (DMS) als Methylierungsreagenz in Gegenwart von Kaliumcarbonat führt zur gewünschten, vollständig geschützten Aminosäure **146**. Der Benzylester wurde hydrogenolytisch bei Atmosphärendruck in Essigsäureethylester als Lösungsmittel, unter Erhalt der freien Carbonsäure **147** in der Aminosäureseitenkette, gespalten.

Die freie Carbonsäure der Aminosäureseitenkette von **147** wurde im nächsten Schritt in einer STEGLICH-Veresterung mit 2-(Trimethylsilyl)-Ethanol in Gegenwart des Kupplungsreagenzes EDCI und DMAP als Katalysator umgesetzt (s. Schema 45). Die vollständig geschützte Aminosäure **148** konnte nach säulenchromatographischer Aufreinigung in 61% Ausbeute erhalten werden.



Schema 45: Einführung der Seitenkettenschutzgruppe TMSE unter Verwendung von TMSE-OH in einer STEGLICH-Veresterung mit dem Carbodiimid EDCI. Die TMSE-Schutzgruppe von **148** kann nach erfolgter SPPS (Fmoc/^tBu-Strategie) unter sauren Bedingungen mit TFA abgespalten werden.

Vorangegangene Untersuchungen zur Synthese des Mal=Glu-Dipeptides zeigten, dass die Einführung des Maleimides mit Hilfe von Maleinsäureanhydrid am *N*-Terminus einer Glutaminsäure mit einem geschützten *C*-Terminus nur in sehr schlechten Ausbeuten verläuft. Daher sah der nächste Schritt in der Syntheseplanung die Verseifung des temporär eingeführten Methylesters vor. Es zeigte sich jedoch, dass die Verseifung mit Natriumhydroxid in einem THF/H₂O Gemisch bei Raumtemperatur eine vollständige Entschützung der TMSE-Seitenkettenschutzgruppe zur Folge hat. Aus diesem Grund wurde wie schon bei der Synthese von Fmoc-L-Thiotrityl-Threonin **73** (s. Kap. 3.1.2.2) auf Trimethylzinnhydroxid zur selektiven Addressierung des Methylesters zurückgegriffen. Auch hier ermöglichte das Reagenz eine selektive Verseifung des Methylesters und das Produkt **149** konnte nach wässriger Aufarbeitung in 76% Ausbeute werden (s. Schema 46).



Schema 46: Selektive Verseifung des Methylesters **148** mit Trimethylzinnhydroxid in Gegenwart anderer Schutzgruppen.

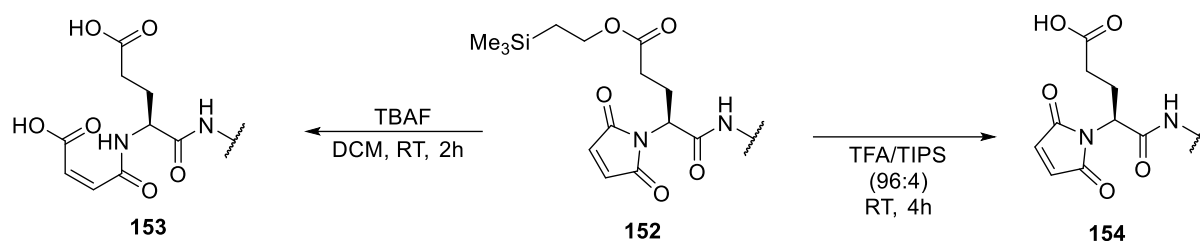
Als nächste Herausforderung in der Synthese stellte sich die selektive Abspaltung der *N*-terminalen Boc-Schutzgruppe heraus, da TMSE und Boc beide unter sauren Bedingungen abgespalten werden können. Die hierzu untersuchten Methoden sind in Tabelle 16 zusammengefasst. In der Literatur beschreiben PAVAN KUMAR *et al.* eine Methode zur Selektiven Spaltung von *tert*-Butylcarbamate-Schutzgruppen in einer Iod vermittelten Reaktion unter neutralen Bedingungen.^[266] Diese kann sowohl in einem Lösungsmittel als auch lösungsmittelfrei durchgeführt werden.

Tabelle 16: Zusammenfassung der untersuchten Reagenzien und Reaktionsbedingungen für die selektive Boc-Entschützung.

Reagenz	Lösungsmittel	Rkt.-Bed.	Umsatz	Nebenreaktion
I ₂ ^[266]	DCM	RT, 12 h	kein	-
I ₂ ^[266]	-	RT, 1 h	kein	-
TFA (20 eq.)	DCM	0 °C, 1 h	75%	keine
HCl (4 M)	Dioxan	RT, 1 h	vollständig	keine

Der finale Maleimidbaustein Mal=Glu(OTMSE) **152** konnte nach wässriger Aufarbeitung in 80% Ausbeute erhalten werden. Die Gesamtausbeute über sieben Stufen liegt bei 35%, womit diese Syntheseroute äußerst effizient ist.

Bei der Anwendung des Dipeptibausteins **152** in der Festphasenpeptidsynthese zeigte sich, dass die selektive Entschützung der TMSE-Schutzgruppe mit TBAF eine Ringöffnung des Maleimides zur Folge hat, womit dieses Reagenz in Gegenwart von Maleimiden vermieden werden sollte. Eine zeitgleiche Abspaltung aller Schutzgruppen in TFA mit TIPS als *scavenger* verlief hingegen vollständig ohne Nebenreaktion(s. Schema 49).



Schema 49: Einschränkung des Mal=Glu(OTMSE)-Dipeptdibausteins **152** in der Festphasenpeptidsynthese. Eine selektive Abspaltung der TMSE-Schutzgruppe mit TBAF an der festen Phase führte neben der gewünschten Entschützung zu einer Ringöffnung des Maleimides hin zum Maloyl-Nebenprodukt **153**. Die Abspaltung mit TFA unter Standardbedingungen führt zur vollständigen Entschützung der TMSE-Schutzgruppe ohne Nebenreaktion.

Für die Ligation des Foldon β -hairpins **157** mit der Suc=Glu-Dipeptideinheit wurden die beiden Teilstränge **155** und **156** synthetisiert und für 4 Stunden in DMSO bei Raumtemperatur zur Reaktion gebracht (s. Tabelle 17). Die Reaktionsverfolgung mittels RP-HPLC zeigte, dass sich auch hier zwei Diastereomere Ausbilden. Nach der präparativen Aufreinigung des Peptides mittels RP-HPLC wurden beide Diastereomere NMR-Spektroskopisch untersucht.

Tabelle 17: Sequenzen im Vergleich mit dem nativen Foldon β -hairpin.

Peptid	N-Term	<i>i</i>	<i>i</i> +1	<i>i</i> +2	<i>i</i> +3	C-Term
96	KQAYVR	Lys	Asp	Gly	Glu	WVLLSG (nativ)
155	KQAYVR	Lys	Cys			
156				Mal	Glu	WVLLSG
157	KQAYVR	Lys	Cys	Suc	Glu	WVLLSG DS1/DS2

Vergleicht man die ^1H -NMR-Spektren der Peptide **121-DS1** und **157-DS1** miteinander zeigt sich, dass das erste Diastereomer mit dem Succinimid-Glutaminsäurebaustein **157-DS1** eine deutlich geringere Dispersion im Amidischen Bereich des Spektrums aufweist. Auch die charakteristische Tieffeldverschiebung der Valin-Amidprotonen von V¹⁴ und V²¹ des Foldon β -hairpins fällt nur sehr gering aus und liegt sogar weiter im Hochfeld als die des Glutamins. Dennoch zieht sich

durch die für die ligierten β -hairpins typische Hochfeldverschiebung der Amid-Protonen der Thioamino-säure an der $i+1$ -Position des β -turns, dass eine schwache Vorzugskonformation vorliegt (s. Abbildung 60). Auch die Faltungspopulation, die aus dem TOCSY-NMR-Spektrum bestimmt wurde weist nur einen Wert von 30% auf, dass die Annahme bestätigt, dass das Peptid **157-DS1** nur eine schwache Tendenz aufweist die Sekundärstruktur eines β -hairpins auszubilden.

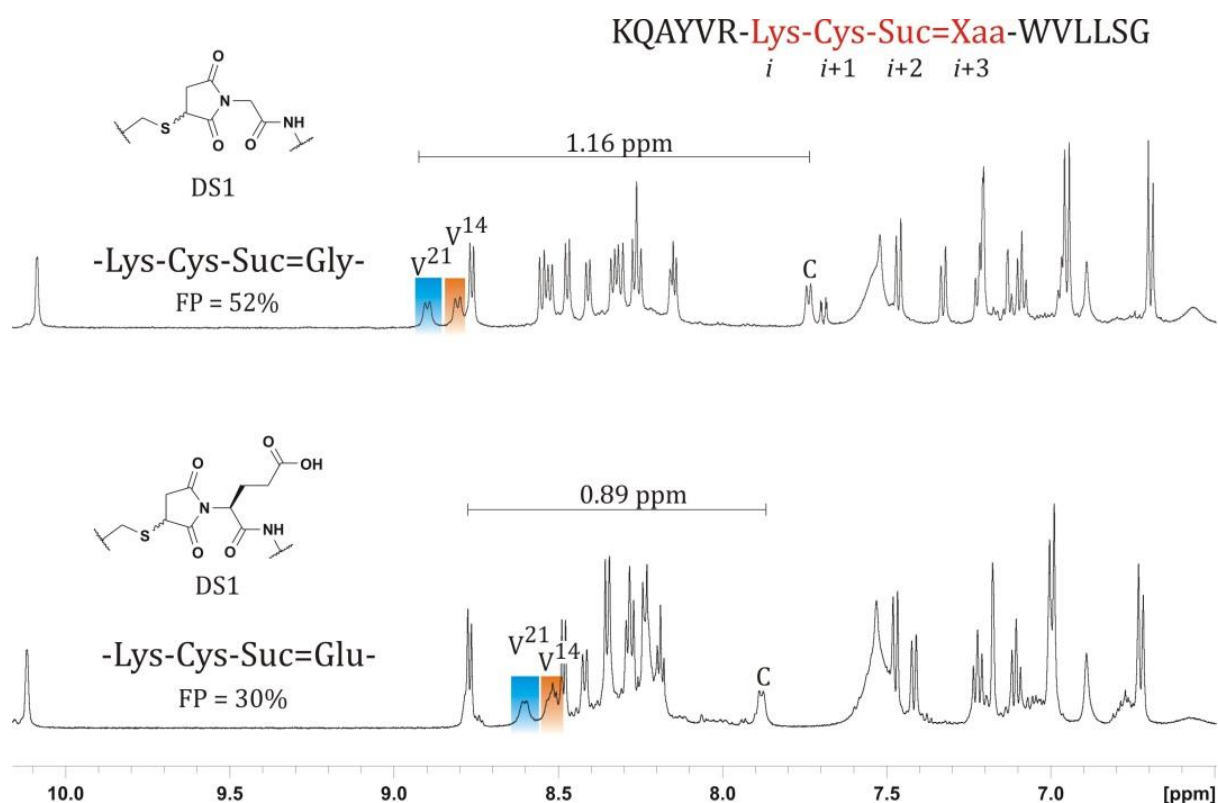


Abbildung 60: Ausschnitt aus dem amidischen Bereich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3) der ersten Diastereomere der ligierten Foldon β -hairpins **121-DS1** und **157-DS1**. Der Suc=Glu-Baustein führt im direkten Vergleich zum Suc=Gly-Baustein zu einer Destabilisierung des hairpins, dass sich in einer reduzierten Signaldispersion sowie der sehr gering ausgeprägten Tieffeldverschiebung der Valin-NH äußert. Auch die Bestimmung der Faltungspopulation (FP) aus dem TOCSY-NMR-Spektrum bestätigt den negativen Einfluss des Suc=Glu-Bausteins auf die Ausbildung der Sekundärstruktur.

Das zweite Diastereomer (**157-DS2**) wies, genau wie schon bei den zuvor beschriebenen Peptiden **121-DS2** (Lys-Cys-Suc=Gly-turn) und **129-DS2** (Lys-Tht-Suc=Gly-turn) eine *random-coil* Struktur auf und wurde darauf hin nicht näher untersucht. Um weiterhin die Aussage zu bestärken, dass das erste Diastereomer des Suc=Glu-Motiv beinhaltenden β -hairpins **157-DS1** eine schwache β -Faltblattstruktur ausbildet, wurden das NOESY-Spektrum im Bereich des hydrophoben clusters zwischen Tyr¹³ und Trp²⁰ mit dem des nativen Foldon β -hairpins verglichen (s. Abbildung 61).

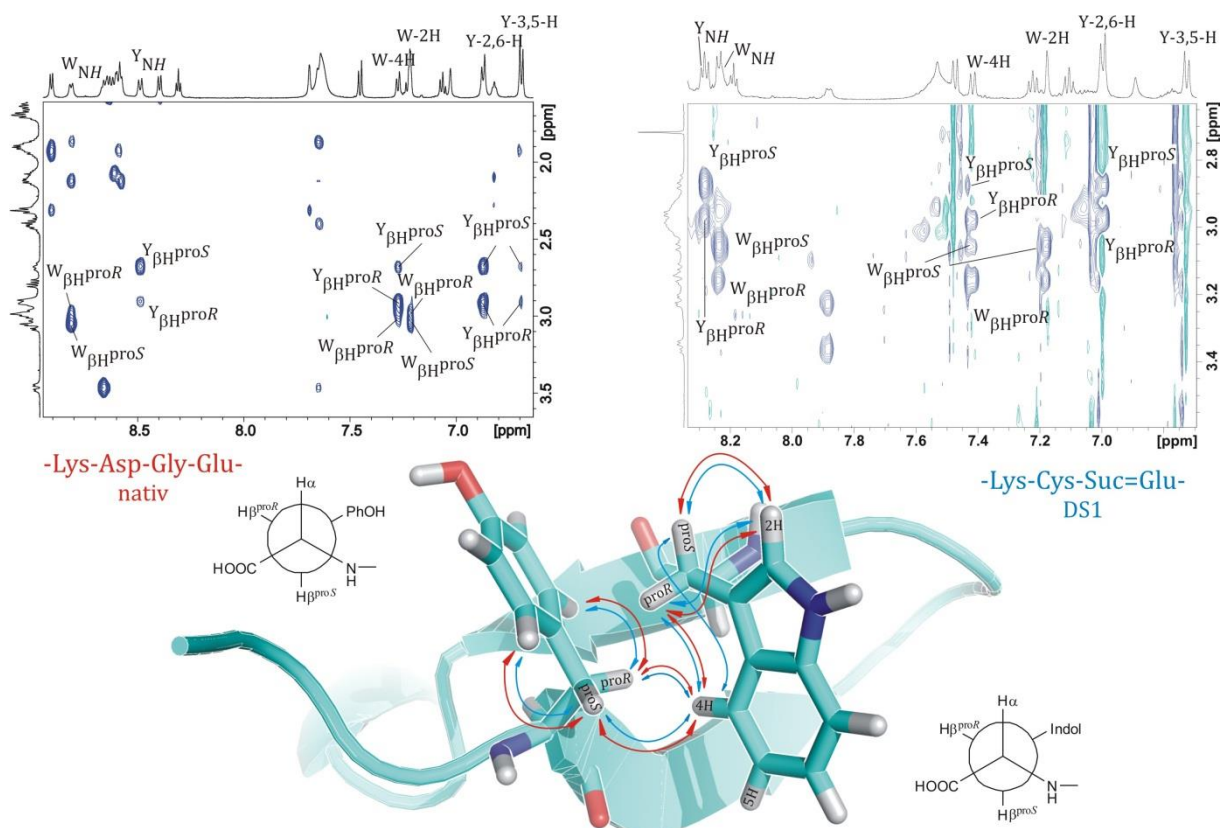


Abbildung 61: Konformationsanalyse und Vergleich der NOESY-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/D₂O (11:1), pH = 3.0, Mischzeit = 150 ms) des nativen Foldon *β*-hairpins **96** (KQAYVR**KDGE**WVLLSG; links) mit dem ersten Diastereomer des Suc=Glu-Baustein beinhaltenden Foldon *β*-hairpin **157-DS1** (KQAYVR**KCSE**WVLLSG; rechts) im Bereich des hydrophoben clusters, bestehen aus Tyr¹³ und Trp²⁰. Die Kontakte sind zur Verdeutlichung in einen Ausschnitt aus der Kristallstruktur des Foldons (PDB-Code: 1RFO) eingetragen. Die NOE-Kontakte belegen, dass der hydrophobe cluster im Falle des Suc=Glu-Peptides **157-DS1** trotz seiner geringen Faltungspopulation von 30% ausgebildet ist. Dennoch zeigt der Kontakt zwischen Trp-βH-proS zum Trp-4H im Falle des ligierten Peptides, dass das System eine hohe Dynamik hat und der Freiheitsgrad um den χ^1 -Winkel des Tryptophans nicht so stark eingeschränkt ist, wie bei dem nativen Foldon *β*-hairpin **96**. Dieser Befund steht im Einklang mit der geringen Faltungspopulation.

Besonders ungewöhnlich beim Vergleich der NOESY-Spektren des ersten Diastereomers des Suc=Glu Foldon *β*-hairpins **157-DS1** mit dem nativen Foldon *β*-hairpin **96**, ist der NOE-Kontakt des Trp-βH-proS zum Trp-4H. Diese dipolare Kopplung der Kerne ist nur möglich wenn der χ^1 -Winkel des Tryptophans einen größeren Spielraum im Vergleich zum nativen *hairpin* aufweist und dadurch der Indolring in seiner Beweglichkeit nicht eingeschränkt ist. Dieser NOE-Kontakt ist bei keinen der zuvor synthetisierten Foldon *β*-hairpins mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur beobachtet worden. Daraus resultiert, dass der Teil des hydrophoben clusters bestehend aus Trp²⁰ und Tyr¹³ des Foldon *β*-hairpins mit einem Suc=Glu-turn nur sehr schwach

ausgeprägt und das gesamte System eine hohe Dynamik aufweist. Durch die geringe Faltungspopulation von 30% wird diese Annahme bestärkt. Ein weiterer Hinweis auf die höhere Flexibilität der Struktur ist auch aus dem Vergleich des Temperaturgradienten der *i*+1-Position mit den Suc=Gly Foldon β -hairpins **121-DS1** und **129-DS1** (vgl. Tabelle 18) zu finden. Hier ist der Wert für das Amidproton des Cysteins im Suc=Glu Foldon β -hairpin **157-DS1** mit 4.3 ppb/K um fast 2 ppb/K höher als bei anderen ligierten Peptiden mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur. Zum einen kann dies auf eine stärkere Orientierung des Cys¹⁷-Amid-Protons hin zum Lösungsmittel deuten und durch eine höhere Dynamik innerhalb des *turns* erklärt werden. Zum anderen kann dies in Betracht der Hypothese, dass sich das Amid-Proton der *i*+1-Position innerhalb einer Wasserstoffbrückenbindung eines δ -turns mit dem Carbonyl des Succinimid-Ringes in der *i*+2-Position befindet (vgl. Kapitel 3.3.1.2), auf eine Schwächung dieser Bindung hinweisen. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich um eine Wasserstoffbrücke zwischen *i*+2- und *i*+3-Position handelt und nicht um eine intramolekulare WBB zwischen dem Cys¹⁷-NH und dem freien Cys¹⁷ C-Term, da hier eine Abhängigkeit zwischen der Faltungspopulation bzw. Dynamik des *hairpins* und der Temperaturgradienten hergestellt werden kann.

Tabelle 18: Vergleich der Temperaturgradienten der Sekundärstrukturbildenden Succinimid-Foldon β -hairpins **121-DS1**, **129-DS1** und **157-DS1** mit dem nativen Foldon β -hairpin **96** (oben). Sofern nicht anders angegeben besitzen alle Werte ein negatives Vorzeichen. Die Einheit der Temperaturgradienten ist [ppb/K].

<i>turn</i>	K	Q	A	Y	V¹⁴	R	Kⁱ	Xⁱ⁺¹	Xⁱ⁺²	Xⁱ⁺³	W	V²¹	L²²	L²³	S	G
KDGE	-	6.8	9.0	9.3	14.3	6.6	9.4	15.5	9.5	+1.3	10.5	17.6	10.0	9.0	7.7	7.8
KTh Σ G	-	7.0	7.5	6.0	8.3	7.0	5.5	2.5	-	-	7.8	8.5	5.3	4.0	7.3	7.8
KC Σ G	-	10.5	7.0	8.0	9.0	7.5	7.0	2.5	-	-	9.0	13.0	9.5	7.5	6.0	7.5
KC Σ E	-	6.7	7.7	n/a	8.0	n/a	n/a	4.3	-	-	n/a	8.7	8.7	7.3	n/a	7.5

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Seitenkette der Glutaminsäure des Suc=Glu-Bausteins an der *i*+3-Position der ligierten Foldon β -hairpins **157-DS1** und **157-DS2**, sowie das im Vergleich zu den Suc=Gly-Dipeptidbausteinen zusätzliche Stereozentrum an dieser Position, nicht zur Stabilisierung des β -hairpins beitragen und der Suc=Gly-Baustein durch seine hohe Flexibilität für die STL innerhalb der *turn*-Region von β -hairpins besser geeignet ist. Dennoch konnte die Einführung der Glutaminsäureseitenkette an dieser Position durch die Synthese des Mal=Glu-Dipeptidbausteins **152** erfolgreich realisiert werden kann.

3.3.1.4.2 Maleimid-D-Phenylalanin-Dipeptidbaustein (Mal=phe)

Auf Grund der *turn*-stabilisierenden Eigenschaften des Suc=phe-Dipeptidbausteins innerhalb der zyklischen Hexapeptide **92-DS1** und **92-DS2** an der *i*+2-Position des *turns* (s. Kap. 3.1) sollte dieser auch innerhalb der ligierten Foldon β -hairpin Peptide untersucht werden. Da sich in den vorangegangenen Kapiteln gezeigt hat, dass bei der Ligation des Foldon β -hairpins mit Maleimiden und Thioaminosäuren nur eine Sekundärstruktur ausgebildet wird, wenn sich das Succinimid an der *i*+2-Position des β -turns befindet, wurde diese Ligationsstelle beibehalten und der Strukturelle Einfluss des D-Phenylalanins an der *i*+3-Position untersucht. Hierzu wurden die Peptideinzelstränge **155** und **158** synthetisiert und wie zuvor beschrieben, zum Succinimid-Thioether beinhaltenden Foldon β -hairpin **159** in der STL umgesetzt (s. Tabelle 19).

Tabelle 19: Sequenzen im Vergleich mit dem nativen Foldon β -hairpin.

Peptid	N-Term	<i>i</i>	<i>i</i> +1	<i>i</i> +2	<i>i</i> +3	C-Term	
96	KQAYVR	Lys	Asp	Gly	Glu	WVLLSG	(nativ)
155	KQAYVR	Lys	Cys				
158				Mal	phe	WVLLSG	
159	KQAYVR	Lys	Cys	Suc	phe	WVLLSG	DS1/DS2

Auch bei diesem Peptid war es möglich die beiden Diastereomere mittels präparative RP-HPLC voneinander zu trennen und NMR-Spektroskopisch zu untersuchen. Im Vergleich der ¹H-NMR-Spektren mit den zuvor beschriebenen Peptiden **121-DS1**, **129-DS1** sowie **157-DS1** zeigt sich jedoch, dass es nicht zur Ausbildung der nativen Sekundärstruktur des Foldon β -hairpins kommt. Dennoch weist das erste Diastereomer **159-DS1** eine relativ hohe Dispersion im amidischen Bereich auf (s. Abbildung 62). Besonders auffällig ist dabei die starke Hochfeldverschiebung der Valin Amidprotonen des β -sheets. Unter Berücksichtigung der Faltungspopulation, die im Falle des ersten Diastereomers **159-DS1** sogar einen negativen Wert einnimmt (-9%) lässt sich ein starker Einfluss des Suc=phe-Dipeptidbausteins auf die Sekundärstruktur ableiten. Anhand der hier erhaltenen Daten kann die Aussage getroffen werden, dass der Einbau dieses Bausteins zu einer tendenziell α -helikalen Struktur (vgl. Kapitel 3.2.2.2) des Peptides führt und somit an der *i*+3-Position des Foldon β -hairpins eine Strukturbrechenden Eigenschaft besitzt. Um weiterhin auszuschließen zu können, dass die gestörte Ausbildung einer Sekundärstruktur im Falle von Peptid **159** nur auf die Stereokonfiguration des Suc=phe-Motivs zurückzuführen ist, wurde das zum Peptid **159** diastereomere Peptid **159a** unter Verwendung des L-Phe Maleimidbausteins **68a** an der *i*+2 und *i*+3-Position synthetisiert. Interessanter weise zeigten auch hier beide Diastereomere **159a-DS1**

und **159a-DS2** keine Vorzugskonformation. Dieses Ergebnis ist überraschend, da es im Kontrast zu den Ergebnissen der zyklischen Hexapeptide **91-95** steht. Hier konnte anhand der Peptide **91** und **92** gezeigt werden, dass lediglich die Stereokonfiguration des Succinimid-Dipeptides zu einer Stabilisierung der Konformation der Hexapeptide beiträgt und die Seitenkette keinen weiteren Einfluss auf die Stabilität hat. Im Vorangegangenen Kapitel konnte anhand des Peptides **157-DS1** gezeigt werden, dass eine L-Konfiguration des Stereozentrums an der *i*+3-Position des β -turns ebenfalls eine Sekundärstrukturausbildung wie im vorangegangenen ermöglicht. Daher kann der Rückschluss gezogen werden, dass der sterische Einfluss des Phenylrings an der *i*+3-Position des Foldon β -hairpins zu einer Destabilisierung der Sekundärstruktur führt. Dieses Ergebnissen gezeigt, dass die Struktur des ligierten Peptides nicht nur von der Wahl der Stereozentren in Nachbarschaft zum Succinimid-Ring abhängt sonder auch von den Seitenkettenfunktionalität des Maleimid-Dipeptidbausteins.

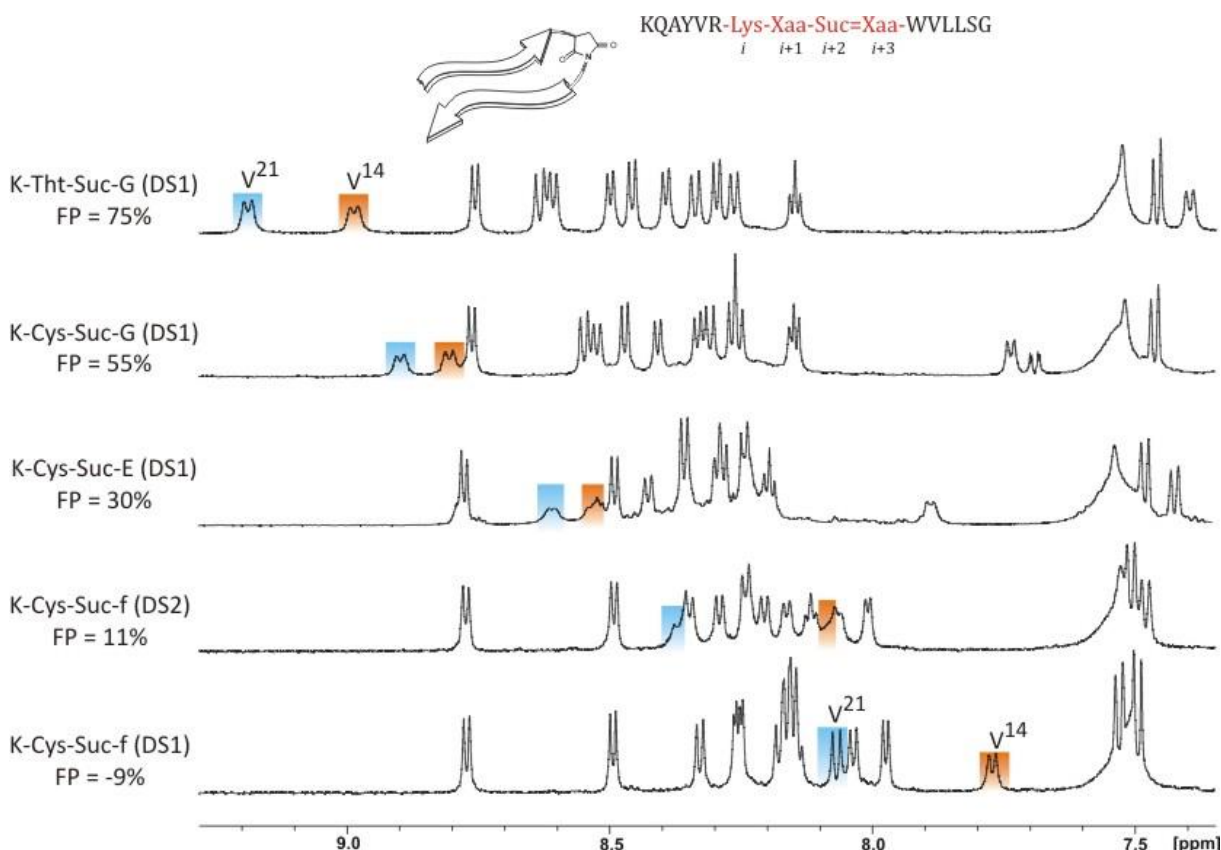


Abbildung 62: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0) im amidischen Bereich der Succinimid-Thioether beinhaltenden, ligierten Foldon β -hairpins. Die für das Foldon, bei einer ausgebildeten Sekundärstruktur, typischen Tieffeldverschiebung der beiden Valin-NH (V^{21} und V^{14}) besitzen einen direkten linearen Zusammenhang mit der Faltungspopulation.

Ein weiteres interessantes Ergebnis aus den Untersuchungen dieser Peptide ist, dass erstmals ein direkter, linearer Zusammenhang zwischen der chemischen Verschiebung der

Valin-Amidprotonen des Foldon β -sheets und der Faltungspopulation beobachtet werden kann (vgl. Abbildung 62). Hierdurch kann nun die bereits aus den Untersuchungen zur Faltungspopulationen bekannte Aussage: „Je stärker ausgeprägt die Sekundärstruktur des β -hairpins, desto weiter im Tieffeld liegen die Amidprotonen der beiden Valine“ um die These „Je weiter sich beide Valin-Amidprotonen im Hochfeld befinden, desto stärker ausgeprägt ist eine α -helikale Struktur“ erweitert werden. In Tabelle 20 sind die chemischen Verschiebungen sowie die Faltungspopulationen der ligierten Peptide zusammengefasst und zur Verdeutlichung in Abbildung 63 graphisch dargestellt.

Tabelle 20: Zusammenfassung der ACS-Werte und der daraus resultierenden Faltungspopulationen sowie der chemischen Verschiebungen der Valin-Amidprotonen des Foldon β -sheets.

<i>turn i → i+3</i>	ACS	FP [%]	δ_{i+1} [ppm]	δV^{14} [ppm]	δV^{21} [ppm]
-K-Tht- Σ -G- (129-DS1)	4.48	71	7.39	8.98	9.19
-K-C- Σ -G- (121-DS1)	4.42	55	7.73	8.80	8.89
-K-C- Σ -E- (157-DS1)	4.36	30	7.88	8.52	8.60
-K-C- Σ -G- (121-DS2)	4.33	16	8.28	8.45	8.35
-K-C- Σ -f- (159-DS2)	4.32	11	8.00	8.07	8.36
-K-C- Σ -f- (159-DS1)	4.26	-9	7.97	7.77	8.06
<i>random coil*</i>	4.29	0			

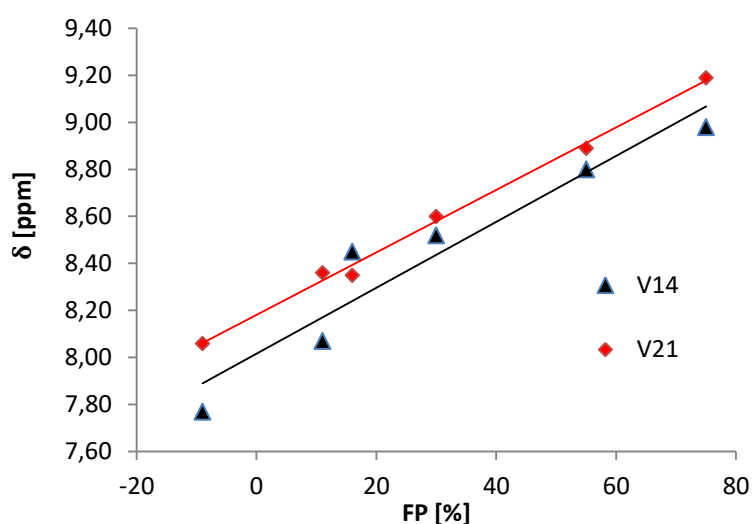


Abbildung 63: Linearer Abhängigkeit der chemischen Verschiebung beider Valin-Amidprotonen des Foldon β -sheets von der Faltungspopulation (vgl. Tabelle 20).

3.3.1.5 Synthese von Fmoc-Aminothiolen und deren Einsatz in der STL

Da bei der Succinimid-Thioether-Ligation mit β -Thioaminosäuren die Seitenkettenfunktionalität des Peptides an dieser Stelle gegen den C-Term der Thioaminosäure ausgetauscht wird, sollte eine Syntheseroute zur Darstellung von β -Aminothiolen entwickelt werden, die es ermöglicht jede beliebige Aminosäureseitenkette an der Ligationsstelle einzuführen. Diese β -Aminothiole bilden in der STL einen isosteren Ersatz für die natürlich im Peptidrückgrat vorkommenden α -Aminosäuren (s. Abbildung 64).

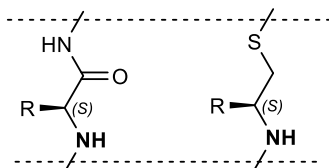


Abbildung 64: β -Aminothiole (**rechts**) als isosterer Ersatz für α -Aminosäuren (**links**) innerhalb des Peptidrückgrates in der STL.

Die Synthese der Aminothiole sollte dabei ausgehend von den kommerziell erhältlichen Fmoc-Aminosäuren beginnen um die Schutzgruppenchemie soweit wie möglich zu reduzieren. Besonderes Interesse galt dem β -Aminothiolderivat mit einer Lysin-Seitenkette (Lysinthiol; Lst). Begründet liegt dies in der Primärstruktur des Foldon β -hairpins. Hier befindet sich das Asp-Gly-Dipeptid an der $i+1$ und $i+2$ -Position des β -turns. Folglich befindet sich bei einer möglichen Aspartimid-Bildung der Amino-Succinimid-Ring an der $i+1$ -Position. Frühere Experimente in der Arbeitsgruppe GEYER deuteten darauf hin, dass dieser einen stabilisierenden Effekt auf die Sekundärstruktur des nativen Foldon β -hairpins hat. Zwar konnte anhand des *Succinimid-Scans* in Kapitel 3.3.1.2 gezeigt werden, dass der isostere Succinimid-Thioether innerhalb des Foldon β -hairpins an dieser Stelle nicht zu einer Ausbildung der Sekundärstruktur führt, jedoch können hierfür auch elektronische sowie konformationelle Gründe eine Rolle spielen. So wird durch die Mutation K¹⁶→C (**120**) das Ladungsmuster des β -turns verändert sowie die Ladung selbst näher an das Peptidrückgrat herangeholt. Die STL zwischen der i und $i+1$ -Position mit einem β -Aminothiol mit der Seitenkettenfunktionalität des Lysins ermöglicht die Synthese eines ligierten Foldon β -hairpins mit einer kleinstmöglichen Veränderung der Struktur (vgl. Abbildung 65). Weiterhin bietet die Synthese der Aminothiole in Kombination mit den Ergebnissen zur Darstellung von chiralen Mal=Xaa-Dipeptidbausteinen (vgl. Kap. 3.3.1.4) eine Möglichkeit die STL weiter zu optimieren. Hierdurch unterliegt die STL keinen Limitierungen mehr durch eine zu starke Mutation in der Primärstruktur wie es bei den zu Beginn beschriebenen, ligierten Foldon β -hairpins mit der Ligationsequenz -Cys-Suc=Gly- (**119-126**) der Fall war. Aus diesem Grund bestand ebenfalls Interesse an einem β -Aminothiol mit der

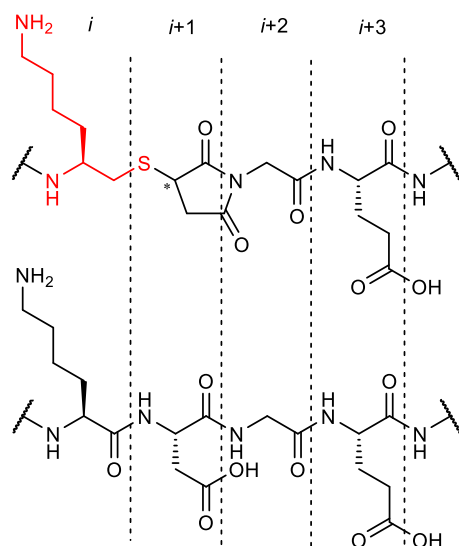
Seitenkettenfunktionalität des Asparagins. Solch ein Asparaginthiol (Ast) ermöglicht zusammen mit dem in Kapitel 3.3.1.4.1 beschriebene Mal=Glu-Dipeptid die Ligation zwischen $i+1$ und

KQAYVR-*turn*-WVLLSG

-*turn*- ($i \rightarrow i+3$)

-Lst-Suc-Gly-Glu-

-Lys-Asp-Gly-Glu- (nativ)



$i+2$ -Position (vgl. Peptid **157**)

des β -turns unter Erhalt aller im Foldon β -hairpin vorkom-

menden Seitenketten. Lediglich der Glycin-Rest der $i+2$ -Position wird durch den Succinimid-Ring

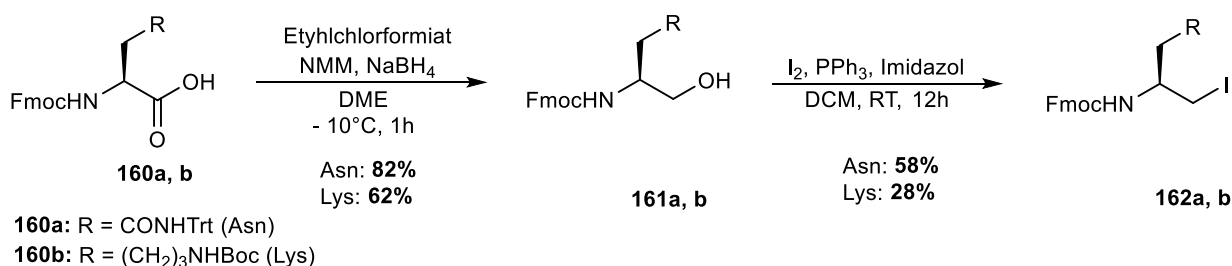
ersetzt. Für die Darstellung der Aminothiole ausgehend von Fmoc-Aminosäuren wurde

basierend auf Ergebnissen von LISKAMP *et al.* eine Syntheseroute entwickelt, die im

Folgenden kurz diskutiert wird.^[267] Ziel der

Abbildung 65: Ein β -Aminothiol mit einer Lysin-Seitenkette (Lst; rot) ermöglicht die STL mit der kleinst möglichen Strukturellen Veränderung (oben) im Vergleich zum *turn* des nativen Foldon β -hairpin **96** (unten).

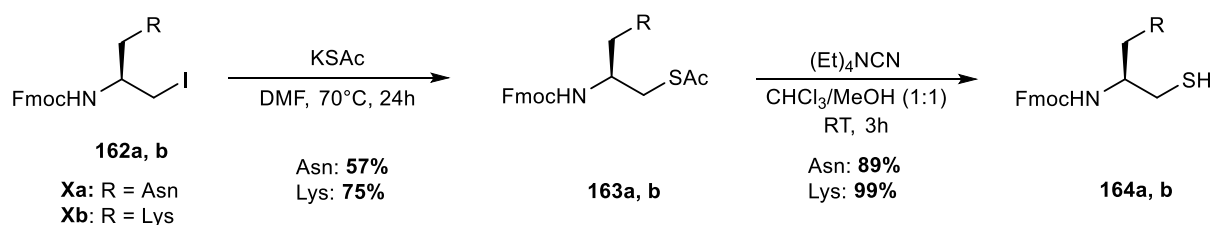
Synthesepaltung war, keiner Limitierung in vorhandenen Seitenkettenschutzgruppen der kommerziell erwerblichen Fmoc-Aminosäuren zu unterliegen. Im ersten Schritt wird daher der freie C-Term der Fmoc-Aminosäuren durch die Bildung des gemischten Anhydrids mit Ethylchlorformiat in Gegenwart von Natriumborhydrid als Reduktionsmittel in den primären Alkohol umgewandelt (s. Schema 50). Das Produkt fällt als farbloser Feststoff aus der Reaktionslösung aus und kann durch einfache Filtration in sehr hoher Reinheit erhalten werden. Die Ausbeuten variieren je nach Seitenkette der entsprechenden Aminosäure zwischen 60-99%.



Schema 50: Reduktion der kommerziell erhältlichen SPPS kompatiblen Fmoc-Aminosäuren **160a, b** durch die Bildung des gemischten Anhydrids und anschließender Umsetzung mit Natriumborhydrid. Zur Einführung des Schwefels wird zunächst der primäre Alkohol **161a, b** in einer Appel-Reaktion mit elementarem Iod in das Iodid **162a, b** überführt.

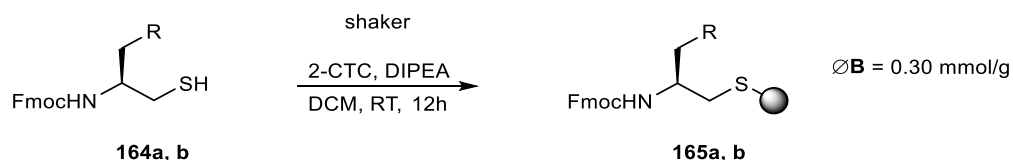
LISKAMP beschreibt im nächsten Schritt zur Einführung des Schwefels eine Aktivierung des primären Alkohols mit Methansulfonsäurechlorid und gibt im Falle von Fmoc-Ser(OtBu)-CH₂OH

Ausbeuten von 97% an.^[267] Im Falle der hier untersuchten Lysin- und Asparagin-Derivate konnte diese Reaktion nicht erfolgreich reproduziert werden. Da sich jedoch bereits bei den Synthesen der zuvor beschriebenen Thioaminoacids (73, 127) eine Einführung des Schwefels über ein Iodid-Derivat der Entsprechenden Aminosäure bewährt hat, wurden auch hier die primären Alkohole **161a, b** in einer APPEL-Reaktion mit elementarem Iod die Iodide **162a, b** überführt (s. Schema 50). Jedoch lieferte hier die Reaktion im Gegensatz zur Synthese von **127** (Thp) nur mäßige Ausbeuten. In beiden Fällen konnte das Produkt als farbloser Feststoff erhalten werden. Im Weiteren verlauf wurden die Iodide **162a, b** mit Kaliumthioacetat in einer S_N2-Reaktion umgesetzt. Hierdurch konnten die vollständig geschützten β -Aminothiole **163a, b** in guten Ausbeuten erhalten werden (s. Schema 51). In der STL befinden sich die zur Ligation notwendigen Thioaminoacids am C-Terminalen Ende des N-Terminalen Einzelstranges. Zur Synthese dieser Einzelstränge muss die Thioaminoacid als erste mit dem C-Terminus unter Ausbildung eines Esters an die feste Phase, in dieser Arbeit 2-CTC-Polystyrolharz, gebunden werden. Da die β -Aminothiole jedoch über keinen C-Term verfügen, muss die Anbindung an das Trägerharz über das Thiol unter Ausbildung eines Thioethers erfolgen. Zum Erhalt des freien Thiols wurde wie bereits beschrieben (s. Schema 27) die von HOLMES *et al.* entwickelte Methode zur selektiven Spaltung von Thioacetaten auf die geschützten Amino-thiol-Derivate **163a, b** angewendet (s. Schema 51).



Schema 51: S_N2-Reaktion des Iodids **162a, b** mit Kaliumthioacetat als Nukleophil hin zum Thioacetat **163a, b** erreicht. Das freie Thiol **164a, b** wird dann über die selektive Spaltung des Thioacetates mit Tetraethylammoniumcyanid erhalten.

In beiden Fällen konnte das freie Thiol **164a, b** in sehr guten Ausbeuten erhalten werden. Somit eignet sich die hier entwickelte Syntheseroute sehr gut zur Darstellung der gewünschten Fmoc-geschützten β -Aminothiole mit beliebigen geschützten Seitenkettenfunktionalitäten ohne aufwendige Schutzgruppenchemie. Die Anbindung des freien Thiols an den 2-CTC-Linker des Trägerharzes wurde basierend auf Arbeiten von DISTEFANO *et al.* durchgeführt (s. Schema 52).^[268]



Schema 52: Reaktionsbedingungen zur Anbindung des freien Thiols **164** an das 2-CTC-Polystyrolharz unter Erhalt des Thioethers **165**. Die Beladungen liegen reproduzierbar bei 0.30 mmol/g.

Auf diese Weise konnten Beladungen des Harzes mit durchschnittlich 0.30 mmol/g erreicht werden. Diese eignen sich sehr gut zur Synthese von mittelgroßen Peptidträgern (bis 40AS). Da unter diesen Reaktionsbedingungen die Disulfidbildung als Konkurrenzreaktion abläuft ist eine Erhöhung der Beladung nur möglich wenn das Thiol über einen langen Zeitraum langsam zugetropft wird. Die Bildung des Disulfids wurde nach Einengen des Filtrats der Harzbeladung mittels HR-MS nachgewiesen. Nach säulenchromatographischer Aufreinigung kann dieses isoliert werden. Weiterhin ist durch eine Reduktion der Disulfidbindung mit TCEP ein *recycling* des β -Aminothiols möglich.

Nach der erfolgreichen Anbindung der Aminothiole an die feste Phase, wurden die Peptideinzelstränge für die STL synthetisiert. Hierbei zeigte sich, dass im Falle des Peptides mit dem Asparginthiol während der Abspaltung vom Harz eine partielle Hydrolyse der Amidbindung des Aminothiols stattfindet. Für das Lysinthiol beinhaltende Peptid wurde diese Reaktion hingegen nicht beobachtet. Hier konnte der Peptidstrang in sehr hoher Reinheit ohne eine weitere Aufreinigung in der STL eingesetzt werden. Das ligierte Foldon β -hairpin Peptid **166** (KQAYVR-Lst-Suc=Gly-Glu-WVLLSG) zeigte im analytischen RP-HPLC-Chromatogramm jedoch keine unterscheidbaren Diastereomere. Nach der Isolation des Ligationsproduktes **166** wurde dieses mittels NMR-Spektroskopie näher untersucht (s. Abbildung 66). Im Amidischen Bereich des TOCSY-Spektrums ist eine vollständige Sequenzierung des Peptides **166** unter Zuhilfenahme des NOESY-Spektrums möglich und auch der Lst-Baustein kann eindeutig identifiziert werden. Weiterhin weisen beide Diastereomere auf Grund von nicht signifikant unterschiedlichen Strukturen kaum voneinander unterscheidbare Signalsätze auf. Lediglich im aliphatischen Bereich des TOCSY-Spektrums können anhand der Succinimid- β -Protonen beide Diastereomere anhand ihrer unterschiedlichen diastereotopen Aufspaltung identifiziert werden. Das Diastereomerenverhältnis liegt auch hier wie schon bei den zuvor beschriebenen ligierten Peptiden bei 1:1. Die Bestimmung der Faltungspopulation von **166** ergab einen Wert von 4%. Damit liegen beide Diastereomere des Peptides als *random coil* Struktur vor. Dieses Ergebnis ist bemerkenswert, da der Foldon *hairpin* mit dem Lysinthiol nur eine minimale Veränderung zum nativen Foldon β -hairpin **96** aufweist und alle Aminosäureseitenketten außer der Mutation Asn¹⁷→Suc beinhaltet.

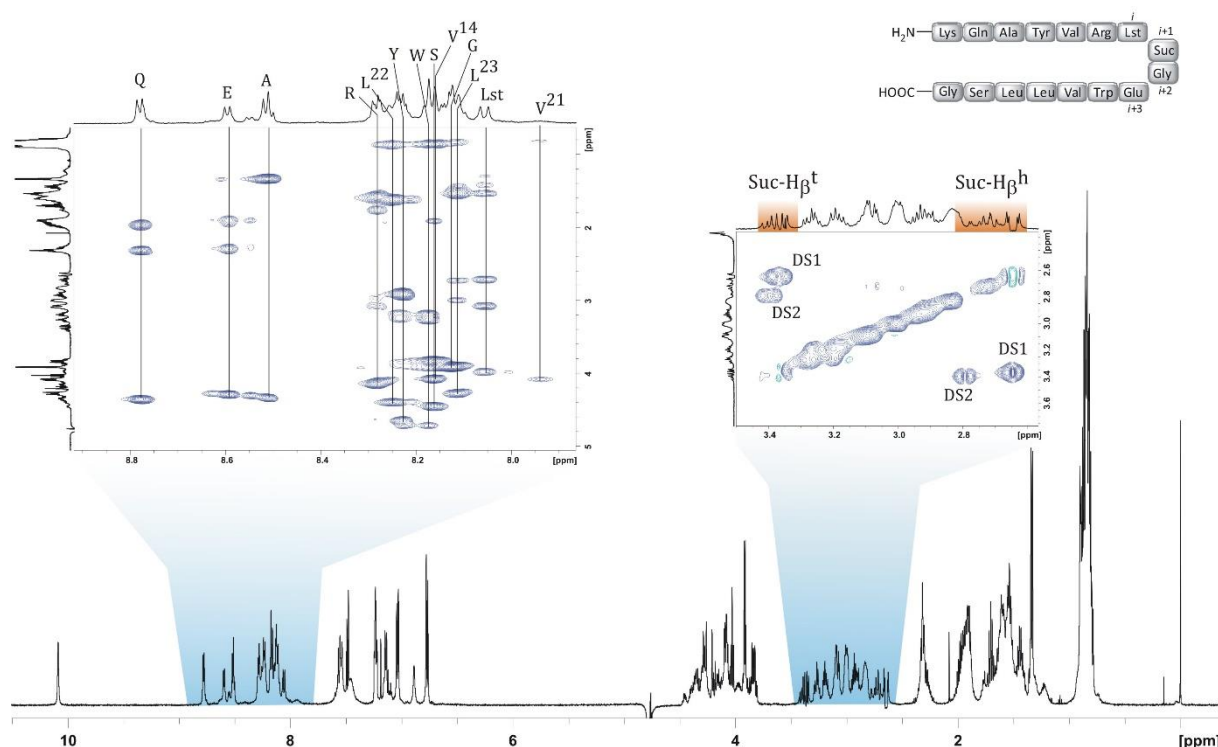


Abbildung 66: ^1H -NMR-Spektrum und Ausschnitte aus dem TOCSY-NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0) des Peptides **166** (KQAYVR-Lst-Suc=Gly-Glu-WVLLSG). Der Amidische Bereich des TOCSY-Spektrums ermöglicht eine Vollständige Sequenzierung des Peptides. Durch die unterschiedliche diastereotopie Aufspaltung der Succinimid- β -Protonen können beide Diastereomere mit einem 1:1 Verhältnis identifiziert werden.

Allerdings wird durch den Lysinthiol-Baustein eine flexible Methylengruppe an Stelle eines Carbonyls innerhalb des Peptidrückgrates eingeführt. Da sich diese innerhalb des β -turns des Foldon *hairpins* befindet ist die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem Carbonyl der i -Position mit dem Amid der $i+2$ -Position nicht mehr möglich. Allerdings kann die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der i - und $i+3$ -Position, die essentiell für einen β -turn ist, weiterhin ausgebildet werden. Somit liefert das Peptid **166** einen guten Einblick in die notwendigen Parameter zur Ausbildung eines nativ faltenden Foldon β -*hairpins*. Es zeigt sich, dass die konformationellen Einflüsse über die elektronischen dominieren. Somit liefert die Synthese der Aminothiole eine wichtige Ergänzung zur STL, allerdings muss die konformative Dominanz des Succinimid-Ringes die sich bereits im *Succinimid-Scan* zeigte, bei der Ligation berücksichtigt werden.

3.3.2 Ligation des Foldon-Miniproteins

Nachdem anhand der isolierten Foldon β -hairpins gezeigt werden konnte, dass die Ligation eines C-terminalen Cystein-Peptides mit einem N-terminalen Maleimid-Peptid, unter Ausbildung eines Succinimid-Thioethers, die native Faltung und somit die gewünschte Sekundärstruktur eines β -Faltblattes ermöglicht, sollte diese Methode auf das Foldon-Miniprotein (27 AS) angewandt werden. Da bei den β -hairpin Peptiden nur eine native Faltung der Sekundärstruktur erreicht werden konnte, wenn sich der Succinimid-Ring an der $i+2$ -Position des β -turns befindet, wurde auch für die Ligation des Foldon-Miniproteins diese Position für den synthetischen Schnitt zur Synthese der beiden Einzelstränge der Ligation gewählt. Die Synthese der Einzelstränge (s. Tabelle 21) wurde, wie zuvor für die Synthese der Foldon β -hairpins beschrieben (s. Kap. 3.2.1.2), mit Hilfe des mikrowellenunterstützten LIBERTY BLUE Peptidsynthesizers in einem 0.1 mM Ansatz realisiert. Die beiden Einzelstränge wurden ohne weitere Aufreinigung in der Ligation eingesetzt.

Tabelle 21: Sequenzen der Einzelstränge und des ligierten Foldons im Vergleich mit dem nativen Foldon.

Peptid	N-Term	<i>i</i>	<i>i+1</i>	<i>i+2</i>	<i>i+3</i>	C-Term	
167	GYIPEAPRDGQAYVR	Lys	Asp	Gly	Glu	WVLLSTFL	(nativ)
168	GYIPEAPRDGQAYVR	Lys	Cys				
169				Mal	Gly	WVLLSTFL	
170	GYIPEAPRDGQAYVR	Lys	Cys	Suc	Gly	WVLLSTFL	DS1/DS2

Die Reaktionskontrolle der STL mittels analytischer RP-HPLC zeigte einen vollständigen Umsatz, jedoch keine trennbaren Diastereomere an. Die entstandenen Produkte wurden anschließend mit Hilfe einer präparativen RP-HPLC isoliert und NMR-spektroskopisch untersucht. Im direkten Vergleich zum nativen Foldon zeigt sich, dass die Dispersion im amidischen Bereich des ligierten Foldons **170** nur sehr gering ist und auch die für die Trimerbildung typischen Hochfeldverschiebungen des Ala⁶- β H sowie der Leu- δ H sind nicht vorhanden (vgl. Abbildung 67). In Kombination mit einer HR-MS konnte das Produkt jedoch zweifelsfrei als das gewünschte ligierte Miniprotein identifiziert werden. Durch die Arbeiten von BJÖRN ECKHARDT und MATTHIAS KÖRLING in der Arbeitsgruppe GEYER konnte bereits gezeigt werden, dass die Einführung von rigiden Dipeptidmimetika innerhalb des β -turns des Foldon-Miniproteins zu einer Reduzierung der thermischen Stabilität oder sogar zum vollständigen Verlust der Tertiär- und Quartärstruktur führt.^[173,210,212,213] Flexible Mimetika hingegen können sich der nativen Proteinumgebung des gesamten Foldons besser anpassen und haben im

Gegensatz zu den isolierten β -hairpins des Foldons eine stabilisierende Wirkung.^[210] Diese Beobachtungen bieten eine gute Erklärung für den hier vorliegenden Fall, dass die ligierte Foldonsequenz **170** auf Grund des rigiden Succinimid-Rings innerhalb des β -turns keine Sekundärstruktur ausbildet.

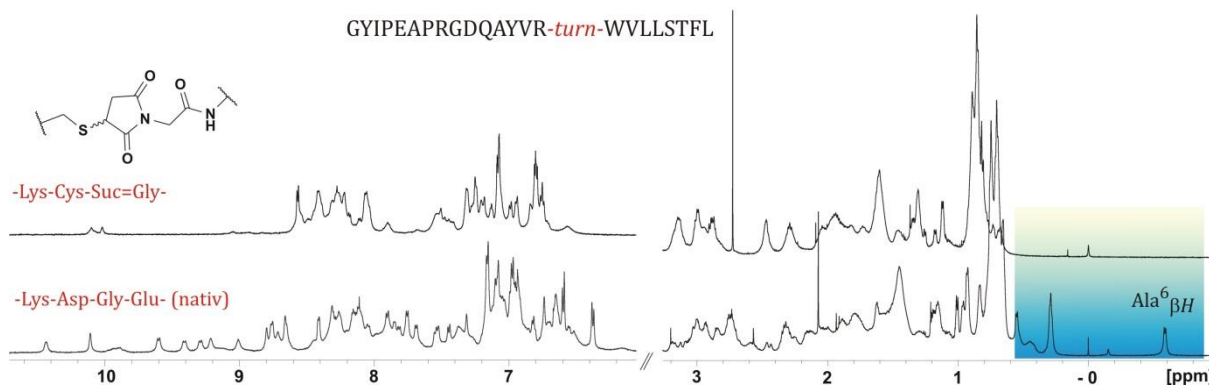


Abbildung 67: Vergleich der ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0) des nativen Foldon **167** (unten) mit der ligierten Foldonsequenz **170-DS1/DS2** (oben). Es ist zu erkennen, dass im amidischen Bereich der Succinimid-Thioether beinhaltenden Foldonsequenz keine große Signaldispersion vorhanden ist und auch die für die Trimerbildung typische Hochfeldverschiebung des $\text{Ala}^6\text{-}\beta\text{H}$ und der Diastereotopen $\text{Leu}^{22/23}\text{-}\delta\text{H}$ kann nicht beobachtet werden. Somit liegt für keines der beiden Diastereomere der ligierten Foldonsequenz eine Ausbildung der Sekundärstruktur des β -hairpins und auch keine der trimeren Quartärstruktur vor.

Zwar konnte anhand des ligierten Foldon β -hairpins **121-DS1** gezeigt werden, dass das Strukturmotiv mit der größten Flexibilität bestehend aus Cys-Suc=Gly mit 52% eine geringere Faltungspopulation im Vergleich zum nativen β -hairpin **96** mit 72% aufweist, dennoch ist der konformative Raum des Succinimid-Rings stark eingeschränkt. Hierdurch wird eine Anpassung an die strukturellen Gegebenheiten der nativen Proteinumgebung erschwert, die letztendlich in einer *random coil* Struktur der ligierten Foldonsequenz **170** mündet.

3.3.2.1 Faltung durch Hydrolyse des Succinimides

Bei ADC's (*Antibody Drug Conjugates*), die unter anderem durch eine thio-MICHAEL-Addition eines Maleimides unter Erhalt des Succinimid-Thioethers aufgebaut werden, wird bei der Anwendung unter physiologischen Bedingungen in der Literatur eine retro-MICHAEL-Addition diskutiert, die zum Verlust der pharmakologischen Wirkung dieser Konjugate führt. Um diese Nebenreaktion zu vermeiden und gleichzeitig die Stabilität der ADC's zu erhöhen, bietet die gezielte Hydrolyse des Succinimid-Ringes einen Ansatz, der von GRAZIANI *et al.* untersucht wurde.^[269,270] Im Falle des ligierten Foldons **170** würde die Hydrolyse des Succinimid-Ringes zu

einer deutlichen Steigerung der konformativen Flexibilität des β -turns beitragen, die wiederum eine Faltung des zentralen β -hairpins und gegebenenfalls die Trimerisierung des Foldons begünstigen kann. Zur Untersuchung des konformationellen Einflusses der Succinimid-Hydrolyse auf die Tertiär- und Quartärstruktur wurde das ligierte Foldon **170** in einem Ammoniumacetatpuffer bei einem pH-Wert von 8.7 zur Reaktion gebracht. Die Hydrolyse wurde mittels RP-HPLC verfolgt. In Abbildung 68 ist das Chromatogramm vor und nach der Hydrolyse abgebildet.

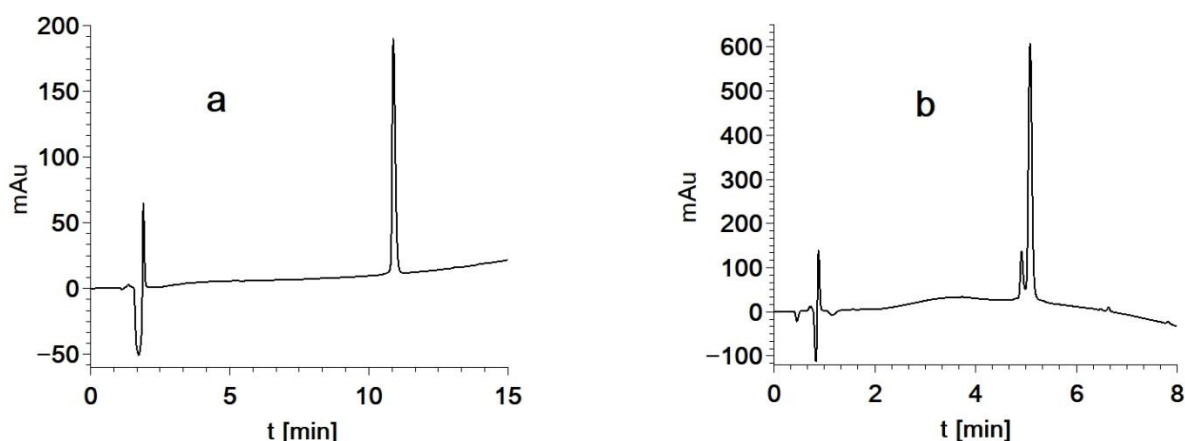


Abbildung 68: Vergleich der HPLC-Chromatogramme des ligierten Foldon-Miniproteins **170** nach der Aufreinigung (a) und nach der Behandlung des aufgereinigten Peptides mit einem Ammoniumacetatpuffer bei pH = 8.7 (b). Durch die Hydrolyse des Succinimid-Ringes bei einem basischen pH-Wert werden neben den beiden Diastereomeren des α -Peptides auch die beiden Diastereomere des β -Peptides gebildet. Im Chromatogramm (b) ist jedoch zu erkennen, dass nur eine dieser Spezies eine unterscheidbare, kürzere Retentionszeit zu den anderen Diastereomeren aufweist und somit isoliert werden kann (im Folgen als **171-DS1** bezeichnet).

Durch die Hydrolyse des Succinimid-Ringes bei einem basischen pH-Wert werden neben den beiden Diastereomeren des α -Peptides auch die beiden Diastereomere des β -Peptides gebildet. Im direkten Vergleich der beiden Chromatogramme zeigt sich, dass nach der Hydrolyse nur eine dieser Spezies eine unterscheidbare, kürzere Retentionszeit zu den anderen Diastereomeren aufweist und somit isoliert werden kann. Interessant hierbei ist auch das Verhältnis der Signale zueinander. Wie bereits eingangs erwähnt (s. Kap. 1.3) liegt nach der Hydrolyse von Aminosuccinimiden ein Verhältnis für *iso*-Asp zu Asp von 3:1 vor.^[128] Unter Berücksichtigung, dass sich unter dem Hauptpeak in Chromatogramm b drei der möglichen vier Spezies befinden, ist auch hier das Verhältnis der beiden möglichen Hydrolyseprodukte 3:1. Wie schon zuvor bei den ligierten Foldon β -hairpins zeigte auch das erste Diastereomer des hydrolysierten Foldons **171-DS1** im ^1H -NMR Merkmale einer nativen Faltung der Sekundärstruktur auf. Alle anderen isolierten Spezies des mit Ammoniumacetatpuffer behandelten Foldons wiesen hingegen im ^1H -NMR-Spektrum keine charakteristischen Merkmale der Proteinfaltung auf. Durch den

Vergleich der NMR-Spektren des nativen Foldons **167** mit dem isolierten, ersten Diastereomer des ligierten Foldons mit hydrolysiertem Succinimid-Ring **171-DS1** zeigt sich sehr deutlich, dass beide Peptide eine ähnliche Struktur einnehmen und auch die für das Foldon typische Quartärstruktur ausbilden. Dies wird durch die starke Dispersion im amidischen Bereich sowie durch die sehr charakteristische Verschiebung der β -Protonen des Ala⁶, die erst nach der Ausbildung des Trimers in Erscheinung tritt, verdeutlicht (s. Abbildung 69).

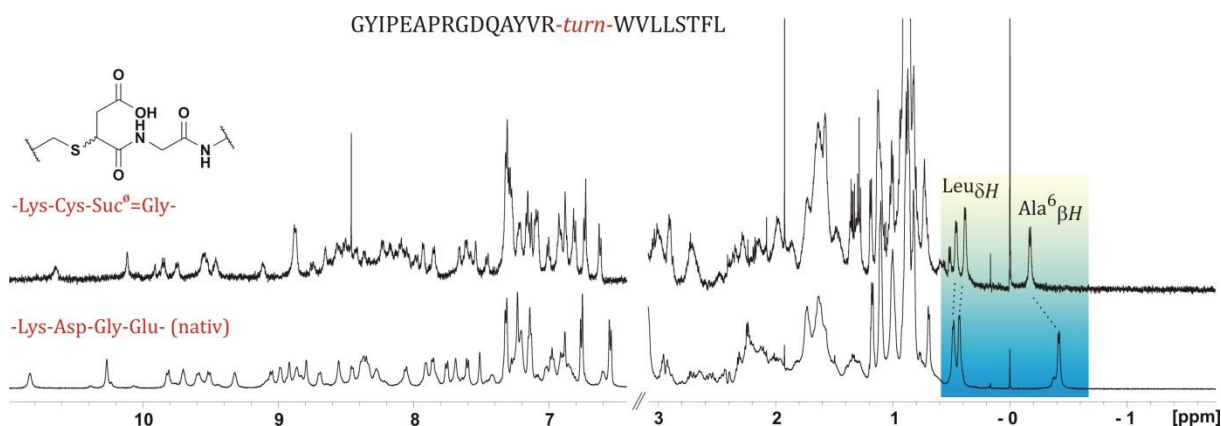


Abbildung 69: Vergleich der ¹H-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/D₂O (11:1), pH = 7.4) des nativen Foldons **167** (unten) mit dem ligierten Foldon mit geöffnetem Succinimid-Ring (Σ^0) **171-DS1** (oben). Durch die Hydrolyse des Succinimid-Rings wird im amidischen Bereich des ligierten Foldons eine deutlich größere Signaldispersion erreicht, die ähnlich zum nativen Foldon **167** ist. Auch die für die Trimerbildung typische Hochfeldverschiebung des Ala⁶- β H und die diastereotopen δ -Protonen der beiden Leucine (Leu²² und Leu²³) weisen ähnliche chemische Verschiebungen wie das native Foldon auf. Dies beweist, dass durch eine pH-Wert-abhängige Hydrolyse des Succinimid-Rings die Ausbildung der Sekundärstruktur der β -hairpin-Untereinheit und auch der trimeren Quartärstruktur erreicht werden kann.

Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass der Aufbau von Miniproteinen mit der hier entwickelten Methode der STL möglich ist. Dennoch konnte anhand der hier erhaltenen NMR-Daten nicht abschließend geklärt werden, ob es sich bei dem ligierten Foldon **171-DS1** um ein Diastereomer des α - oder des β -Peptides handelt. Da ein β -Peptid innerhalb des *turns* durch die Einführung einer zusätzlichen Methylengruppe jedoch eine Verschiebung des natürlich vorkommenden Peptidrückgradregisters zur Folge und somit einen destruktiven Charakter auf die gesamte Proteinstruktur hätte, scheint diese Möglichkeit eher unwahrscheinlich, kann aber schlussendlich auf Grundlage der hier durchgeführten Experimente nicht ausgeschlossen werden. Weiterhin zeigt dieses Experiment, dass durch eine pH-Wert-abhängige Hydrolyse des Succinimid-Ringes die Ausbildung der Sekundärstruktur des β -hairpins und auch der trimeren Quartärstruktur erreicht werden kann. Somit dient der Succinimid-Thioether im Foldon als pH-abhängiger Schalter für die Proteinfaltung. Hierdurch ergeben sich neue Anwendungsgebiete für Succinimid-Thioether in der medizinischen- oder Peptidchemie.

3.4 Peptidepitope in der Diagnostik der rheumathoiden Arthritis

Peptide haben besonders in den letzten Jahren in der pharmazeutischen Industrie als Wirkstoffe das Interesse auf sich gezogen, da sie eine hohe Spezifität gegenüber Antikörpern sowie die Fähigkeit besitzen, neuartige *targets*, vor allem durch Protein-Protein-Wechselwirkungen, zu adressieren.^[271] Durch ihre mittlere Größe, zwischen kleinen Molekülen und Biologika, sowie der synthetischen Zugänglichkeit, bilden Peptide eine viel versprechende Klasse von therapeutischen Wirkstoffen, besonders zur Behandlung von Krankheiten, die mit klassischen niedermolekularen Verbindungen nicht ausreichend therapiert werden können.^[272] Mit Hilfe von *peptide screening* und *phage display* Studien konnten viele neue bioaktive Teilbereiche dieser Peptide als sogenannte Epitope, identifiziert werden. Diese Epitope befinden sich meist in einem kleinen Bereich auf der Oberfläche der Proteine und zeichnen sich durch ihre wohldefinierte dreidimensionale Struktur aus.^[273] Ein Epitop, das eine wichtige Rolle in der

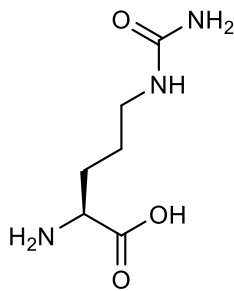


Abb. 70: L-Citrullin

Diagnosik von rheumathoider Arthritis (RA) spielt, ist ein aus dem Filaggrin (**Filament aggregierendes Protein**) abgeleitetes Peptid, das die ungewöhnliche Aminosäure Citrullin (Cit; s. Abbildung 70), ein enzymatisches Hydrolyseprodukt des Arginins, beinhaltet. Durch die hohe Affinität von ACP-Antikörpern (ACPA, *Anti-Citrullinated Protein/Peptide Antibody*) zu citrullinierten Peptiden, sind diese Antikörper sehr spezifische serologische Marker für RA und da sie nur sehr selten bei anderen RA-ähnlichen Krankheiten beobachtet werden, ermöglichen sie

somit eine hohe diagnostische Spezifität.^[280,281] Studien von VAN VENROOIJ *et al.* konnten zeigen, dass besonders der Abschnitt 303-324 der Filaggrin-Sequenz gut für die Antikörpererkennung geeignet ist und die Aminosäure Citrullin eine essentielle Rolle in dem Erkennungsprozess spielt und somit als Hapten des Epitops gilt.^[282]

Um die Präsentation eines Haptens am Wirkort zu verbessern und die generelle Stabilität des Peptides zu erhöhen, existieren mehrere Ansätze, wie die Zyklisierung der Peptide durch die Ausbildung von Disulfidbrücken oder einer Amidbindung zwischen *N*- und *C*-Terminus des Rückgrats, Steigerung der konformativen Restriktion durch das Hinzufügen von zusätzlichen kovalenten Bindungen, Einführen von unnatürlichen- oder D-Aminosäuren und der Konjugation mit „Trägermolekülen“ wie zellpenetrierenden Peptiden oder Polyethylenglykol.^[271,274–278] Neben diesen Möglichkeiten zur Stabilisierung der Peptide die auf Punktmutationen der Peptidsequenz zurückzuführen sind, bietet auch das Konzept des „*grafting*“ einen weiteren aussichtsreichen Ansatz zur erfolgreichen Präsentation von Epitopen. *Grafting*, zu Deutsch Veredelung oder Pfropfung, ist ein Begriff der aus der Botanik entliehen wurde und das Aufbauen einer chimären Pflanze zur vegetativen Vermehrung beschreibt. Auf molekularer

Ebene bedeutet dies den Transfer eines Bindungsepitops in ein formstabiles, meist zyklisches (natürlich vorkommendes) Peptidgerüst. Ein prominentes Beispiel für solch ein Gerüst ist das Cystein Knotenpeptid (Cyclotid) Kalata B1, das durch *grafting* unter anderem in Immuntherapien zur Behandlung von multipler Sklerose eingesetzt wurde.^[279]

Auch VAN VENROOIJ konnte basierend auf seinen ersten Arbeiten durch eine Punktmutation der beiden in der linearen Filaggrin-Sequenz cfc1 **172** enthaltenen Serin-Reste hin zu Cystein-Resten das Peptid durch die Bildung einer Disulfidbrücke zyklisieren (cfc1-cyc, **173**) und somit die Selektivität der Antikörpererkennung erhöhen (vgl. Tabelle 22). Da diese zyklischen citrullinierten Peptide (CCP: *cyclic citrullinated peptides*) mit einer sehr hohen Selektivität an RA-Autoantikörper binden können, ermöglichte dies die Weiterentwicklung hin zu einem heute kommerziell erhältlichen anti-CCP-ELISA-Test.^[283] Die Identifizierung von Epitopen, die RA-Antikörper-Subtypen unterscheiden können und somit dieser Peptidklasse eine noch größere diagnostische und prognostische Relevanz zukommen lassen, ist aktueller Gegenstand der Forschung.^[284]

Im Rahmen der Dissertationen von ANDREAS SCHRIMPF und SABRINA FISCHER im Arbeitskreis GEYER konnten Belege dafür gefunden werden, dass die citrullinierten Filaggrin-Peptide eine β -hairpin-Struktur bei der Erkennung der Antikörper einnehmen. Weiterhin konnte durch gezielte Punktmutationen der Peptide eine definierte Konformationsänderung der β -hairpin-Struktur erzielt werden, die die Selektivität der Antikörpererkennung beeinflusst.^[246,285–287] Erste Untersuchungen zur Präsentation des Filaggrin-Epitops an der Oberfläche eines Proteins wurden durch Punktmutationen des trimeren Foldon-Miniproteins im Rahmen der Dissertation von MATTHIAS KÖRLING im Arbeitskreis GEYER durchgeführt.^[212] Hierzu wurde das für die Erkennung wichtige Hapten Citrullin an der *i*+1-Position des Foldon β -turns eingeführt und das Foldon hinsichtlich seiner Trimerstruktur untersucht.^[212]

Tabelle 22: Vergleich des cfc1 Peptides der Filaggrin Sequenz mit den chimären Foldon und Foldon β -hairpins. (X = L-Citrullin; x = D-Citrullin).

Peptid	Sequenz
cfc1 (172)	SHQES - TXGR - SRGRSGRSGS
cfc1-cyc (173)	KHQ $\overline{\text{CHQES - TXGR - SRGR}}$ CGRSGS
Foldon (174) ^[212]	GYIPEAPRGDQAYVR - KXGE - WVLLSTFL
Foldon (175) ^[212]	GYIPEAPRGDQAYVR - KXGR - WVLLSTFL
Foldon β -hairpin (102)	KQAYVR - KXGE - WVLLSG
(103)	KQAYVR - KxGE - WVLLSG
(176)	KQAYVR - TxGR - WVLLSG

Diese Mutation des Foldon **174** führte zu einer verringerten thermischen Stabilität des Trimers, die sich in einem verringerten Faltungsgrad des zentralen β -hairpins widerspiegelt. Erweiterte Punktmutationen innerhalb des *turns*, wie dem Einführen eines Arginin-Restes an der *i*+3-Position sowie innerhalb des β -Strangs an der Position 21, führte im Falle des Foldon **175** zu einem vollständigen Verlust der Trimerstruktur, zeigte jedoch im Vergleich zu **174** im ELISA-Test eine nur geringfügig schwächere Affinität zu den CCP-Antikörpern als das Referenzpeptid cfc1-cyc.^[212]

Basierend auf dem Fakt, dass der zentrale Foldon β -hairpin in **174** durch die Einführung des Citrullin an der *i*+1-Position des β -turns nur einen geringen Faltungsgrad aufweist, wurde der isolierte β -hairpin **102** mit dieser Mutation bei der in Kapitel 3.2 entwickelten Methode zur Bestimmung der Faltungspopulation als Referenzpeptid synthetisiert. Es zeigte sich, dass auch der Foldon β -hairpin **102** nur eine geringe Faltungspopulation von 35% aufwies (s. Abbildung. 71). Diese wenig populierte Vorzugskonformation ist vergleichbar mit dem in Kap. 3.3.1.4.1 beschriebenen Suc=Glu Foldon β -hairpin **157-DS1**. Da L-Citrullin nicht in der Lage ist an der *i*+1-Position einen β -turn effektiv zu induzieren sind als Folge daraus die Wechselwirkungen innerhalb des hydrophoben *clusters* zwischen RW sowie YL²² geschwächt, was in einer höheren Flexibilität des Systems resultiert.

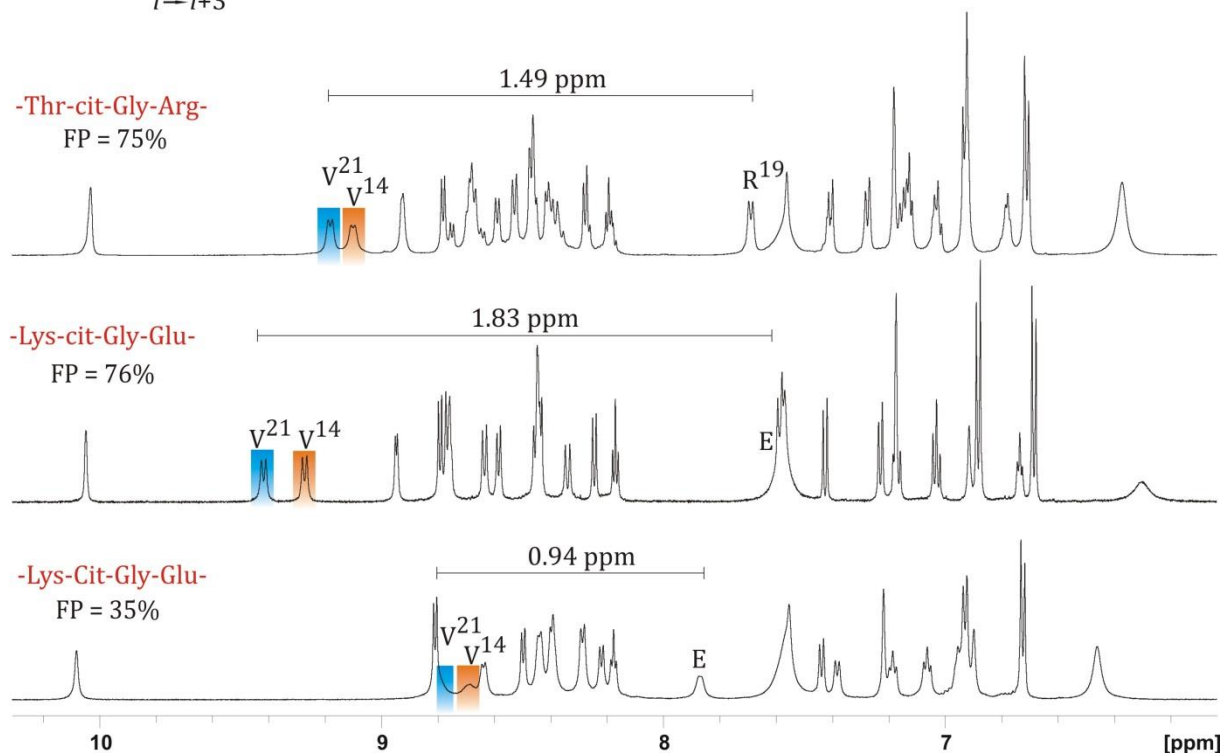


Abbildung 71: Vergleich der ¹H-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/D₂O (11:1), pH = 3.0) der chimären Foldon β -hairpins **102**, **103**, **176**, die den Einfluss der Stereokonfiguration des Citrullins an der *i*+1-Position auf die Faltungspopulation der Peptide verdeutlichen.

In Kooperation mit ANDREAS SCHRIMPF durchgeführte ELISA-Tests zeigten, dass der *hairpin* **102** ebenfalls keine Affinität zu den CCP-Antikörpern besitzt. Durch eine Änderung der Stereokonfiguration des L-Citrullins in Peptid **102** hin zu D-Citrullin (cit; x) konnte der β -*hairpin* **103** stabilisiert werden und wies mit einer Faltungspopulation von 76% sogar einen höheren Wert als der native *hairpin* **96** mit 72% auf (vgl. Kap. 3.2.1.2.1). Durch die Änderung der Stereokonfiguration des Citrullins an der *i*+1-Position war es sogar möglich den vollständigen Filaggrin-*turn* auf den Foldon β -*hairpin* zu übertragen und zu stabilisieren (s. Peptid **176** in Abb. 71). Zeigten vorangegangene *grafting*-Experimente beim Einfügen des Filaggrin-*turns* in den Foldon β -*hairpin* einen vollständigen Verlust der Vorzugskonformation im ^1H -NMR, konnte hier ein nativer Faltungsgrad erreicht werden (vgl. Abb. 71).

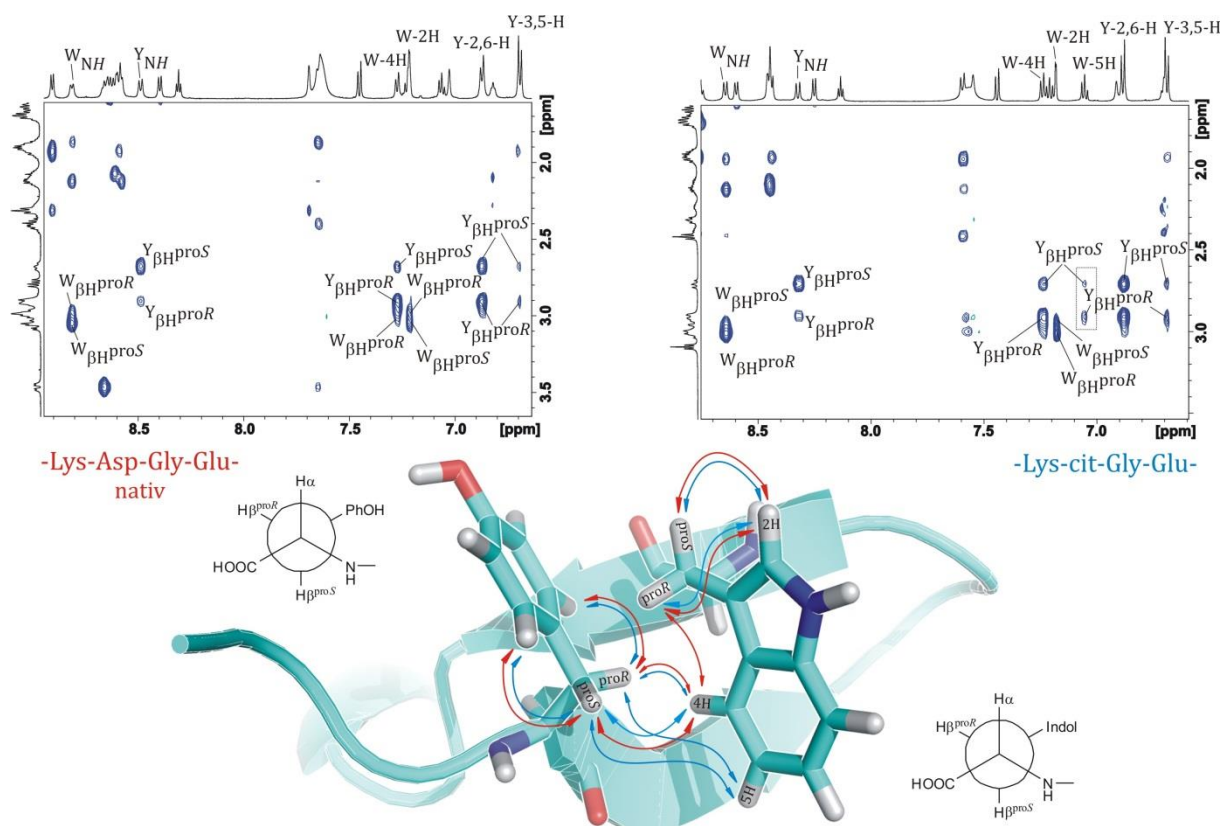


Abbildung 72: Konformationsanalyse und Vergleich der NOESY-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/D₂O (11:1), pH = 3.0, Mischzeit = 150 ms) des nativen Foldon β -*hairpins* **96** (KQAYVR**KDGE**WVLLSG; links) mit dem an der *i*+1-Position beinhaltenden D-Citrullin Foldon β -*hairpin* **103** (KQAYVR**KxGE**WVLLSG; rechts) im Teilbereich des hydrophoben *clusters*, bestehend aus Tyr¹³ und Trp²⁰. Die Kontakte sind zur Verdeutlichung in einen Ausschnitt aus der Kristallstruktur des Foldons (PDB-Code: 1RFO) eingetragen. Die NOE-Kontakte belegen, dass der hydrophobe *cluster* bei beiden Peptiden nahezu identische Signalsätze aufweist. Der signifikanteste Unterschied liegt in der dipolaren Kopplung zwischen dem Trp-5H mit den Tyr- β H im Falle des Citrullin-Foldons **103**. Dies deutet auf eine Reduzierung der typischen rechtsgängigen Verdrillung des Foldon β -*hairpins* hin.

Um den konformationellen Einfluss des D-Citrullin auf den Foldon β -hairpin näher zu untersuchen, wurde eine Konformationsanalyse mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten durchgeführt und Peptid **103** mit dem nativen β -hairpin verglichen. Die Seitenkettenrotamere beider Peptide weisen identische Konformationen auf und auch das NOE-Muster beider Peptide innerhalb des hydrophoben *clusters* ist nahezu identisch. Der einzige bemerkenswerte Unterschied liegt im Falle des D-Citrullin *hairpins* **103** im NOE-Kontakt zwischen dem Trp-5H des Indolrings und beiden β -Protonen des Tyrosins. Dieser ist untypisch für die Foldon β -hairpins und wurde in vergleichbaren Peptiden nicht beobachtet. Da die Faltungspopulation beider *hairpins* mit 72% (**96**) und 76% (**103**) fast identische Werte aufweist und somit ein starker Unterschied in der Dynamik der beiden *hairpins* ausgeschlossen werden kann, wird dieser Kontakt auf eine Reduzierung der für β -hairpins typischen rechtsgängigen Verdrillung des Faltblattes zurückgeführt. Hierdurch ist eine Verringerung des Abstands der Indol-Seitenkette des Tryptophans zum Tyrosin-Rest (vgl. Abbildung 72) möglich. Auch der Vergleich der Temperaturgradienten (s. Tabelle 23) untermauert die These der reduzierten Verdrillung des *hairpins*, da auch der Abstand zwischen K¹⁶ und E¹⁹ sowie V²¹ und V¹⁴ verringert wird, was eine erhöhte Abschirmung der Amidprotonen zur Folge hat und stärkere Wasserstoffbrückenbindungen ermöglicht, die sich im Vergleich zum nativen β -hairpin in den kleineren Temperaturgradienten widerspiegeln.

Tabelle 23: Vergleich der Temperaturgradienten des D-Citrullin-Foldon *hairpin* **103** dem nativen Foldon β -hairpin **96**. Sofern nicht anders angegeben besitzen die Gradienten ein negatives Vorzeichen.

<i>turn</i>	K	Q	A	Y	V¹⁴	R	Kⁱ	Xⁱ⁺¹	Gⁱ⁺²	Eⁱ⁺³	W	V²¹	L²²	L²³	S	G
KDGE	-	6.8	9.0	9.3	14.3	6.6	9.4	15.5	9.5	+1.3	10.5	17.6	10.0	9.0	7.7	7.8
KcitGE	-	8.0	8.0	9.5	12.0	7.5	8.0	12.0	9.0	+1.0	10.0	13.0	8.5	5.0	7.5	7.5

Auch das Amid-Proton des Citrullins an der *i*+1-Position weist einen geringeren Gradienten auf, was durch eine geringere Exposition hin zum Lösungsmittel erklärt werden kann. Dennoch sind all diese Daten nur Indizien und dienen nicht als Beweis für eine reduzierte Verdrillung des *hairpins*. Weiterhin kann auch die von SALEMME *et al.* beschriebene kooperative Beweglichkeit, die einen wesentlichen Teil zur Stabilität der hochdynamischen β -hairpin Struktur beiträgt in Kombination mit der geänderten *turn*-Geometrie, das Auftreten des NOE-Kontaktes zwischen dem Trp-5H und den Tyr- β -Protonen und den verringerten Temperaturgradienten erklären.^[288] Eine Konformationsanalyse und direkter Vergleich des D-Citrullin Peptides **103** mit dem L-Citrullin Peptid **102** ist auf Grund der gering populierten Vorzugskonformation sowie der höheren Flexibilität von **102** und der damit einhergehenden starken Signalüberlappung in den

NMR-Spektren leider nicht möglich. Das Filaggrin-Foldon-Hybridpeptid mit D-Citrullin **103** an der *i*+1-Position wies jedoch genau wie das schwach populierte L-Citrullin Hybridpeptid **102** in den ELISA-Tests keine biologische Aktivität auf. Auch das chimäre D-Citrullin-Peptid **176** mit dem gesamten *turn* des Filaggrin-Peptides innerhalb des Foldon β -hairpins hatte keine Aktivität gegenüber den anti-CCP-Autoantikörpern.

Weitere von ANDREAS SCHRIMPF synthetisierte Filaggrin-Foldon-Hybridpeptide (Asp²⁷→Cit; E¹⁹,V²¹→R; R¹⁶→T) zeigten zunächst ebenfalls keine signifikante biologische Aktivität. Erst durch die Mutation von V¹⁴→E und V²¹→R konnte eine biologische Aktivität des Haptens beinhaltenden Filaggrin-*turn* (TXGR) in einem Foldon β -hairpin nachgewiesen werden. Gemessen an der Anzahl der mutierten Aminosäuren stellt dieses chimäre Peptid eine 50:50 Mischung des nativen Foldon β -hairpins **96** und der Filaggrin-Sequenz cfc1-cyc **173** dar und wies nur eine geringfügig geringere Affinität zum anti-CCP-Antikörper auf als das Referenzpeptid cfc1-cyc.^[285]

Um zu überprüfen, ob ein Aufbau von Haptenen mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten STL ermöglicht werden kann, um eine Antikörperselektivität erreichen, sollte der Ansatz der Punktmutation des Foldon β -hairpins als Modellsystem mit der STL kombiniert werden. Dieser sollte wie die vorangegangenen Ergebnisse von SCHRIMPF gezeigt haben in biologischen Tests inaktiv sein. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der Foldon β -hairpin sich besser zur Methodenentwicklung im Vergleich zur synthetisch anspruchsvolleren Filaggrinsequenz eignet. Die Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

3.4.1 Die Succinimid-Thioether-Ligation zum Aufbau von Haptenen

Basierend auf den vorangegangenen Ergebnissen zur Synthese der Filaggrin-Foldon-Hybridpeptide und den Untersuchungen zur biologischen Aktivität dieser Peptide durch

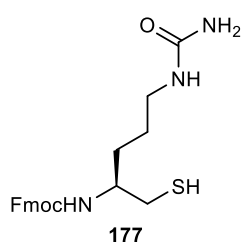


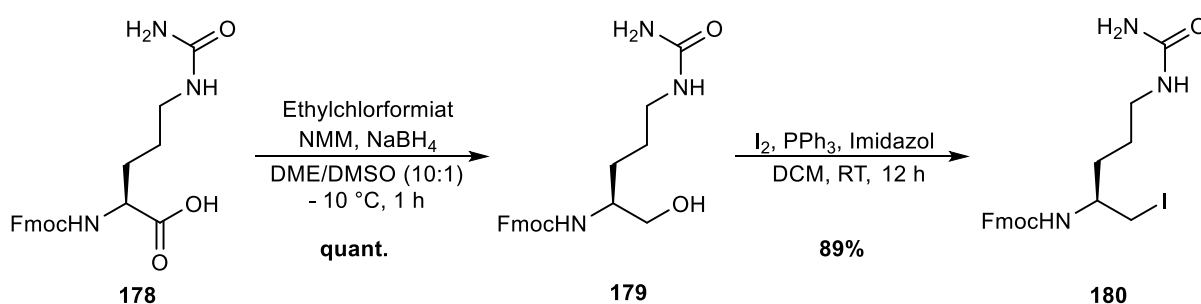
Abb. 73:
Fmoc-L-Citrullinethiol

ELISA-Assays, sollte überprüft werden, ob eine Kombination aus Punktmutation und der Succinimid-Thioether-Ligation und der damit einhergehenden Konformationsänderung des β -turns eine erfolgreiche Präsentation des Haptens des Filaggrin-Bindungs epitops zur serologischen Erkennung von rheumathoider Arthritis innerhalb des ligierten Foldon β -hairpins ermöglicht. Um diese Aufgabe zu bewältigen,

sollte die für die Ligation notwendige Thioaminosäure an der *i*+1-Position des Foldon β -hairpins gegen die für die Erkennung der Antikörper essentielle Aminosäure Citrullin an dieser Stelle ersetzt werden. Um weiterhin eine Ligation zwischen der *i*+1 und *i*+2-Position zu ermöglichen, sollte daher ein Fmoc-geschütztes β -Aminothiol mit der Citrullin Seitenkette, im Folgenden als „Citrullinethiol“ bezeichnet, synthetisiert werden, das in der SPPS eingesetzt werden kann (s. Abbildung 73).

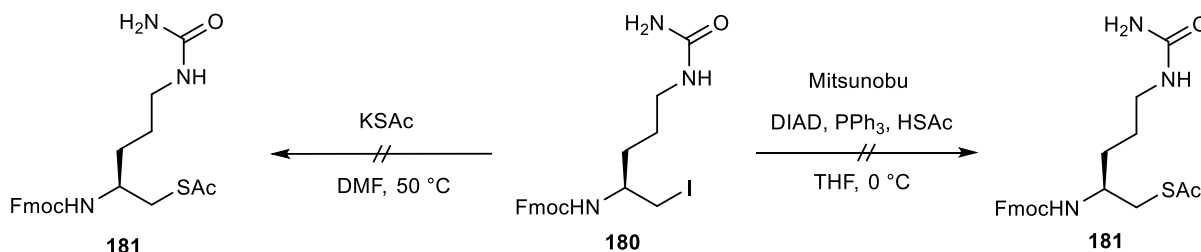
3.4.1.1 Synthese von Citrullinthiol

Zur Darstellung des Citrullinthiol-Bausteins **177** wurde zunächst eine Syntheseroute analog zu der in Kapitel 3.3.1.5. beschriebenen Synthese der Aminothiole, ausgehend von Fmoc-L-Citrullin, untersucht. Auch hier konnte die Reduktion der Carbonsäure durch Bildung des gemischten Anhydrids mit Ethylchlorformiat in Gegenwart von Natriumborhydrid in quantitativen Ausbeuten realisiert werden. Der resultierende Alkohol **179** wurde als farbloser Feststoff erhalten. Dieser wurde anschließend in einer APPEL-Reaktion mit elementarem Iod unter Inertgas in das Iodid **180** überführt. Dieses konnte mit einer guten Ausbeute von 89% erhalten werden (s. Schema 53).



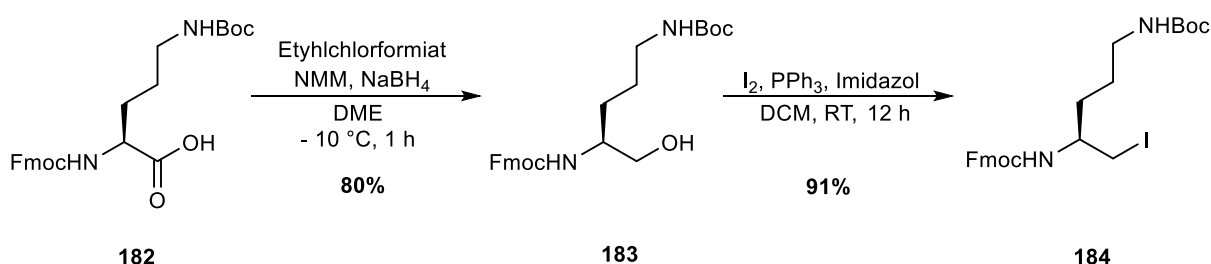
Schema 53: Reduktion von Fmoc-L-Citrullin **178** mit Natriumborhydrid nach Bildung des gemischten Anhydrids mit Ethylchlorformiat. Der gebildete Alkohol **179** wird in einer APPEL-Reaktion mit elementarem Iod in das Iodid **180** überführt.

Anschließend sollte in einer S_N2-Reaktion das Iodid **180** mit Kaliumthioacetat in das Thioacetat **181** überführt werden. Jedoch konnte unter identischen Reaktionsbedingungen wie bei den zuvor beschriebenen Synthesen der β -Aminothiole nicht das gewünschte Produkt isoliert werden. Um die Reaktionsbedingungen abzumildern wurde das Iodid **180** in einer MITSUNOBU-Reaktion mit Thioessigsäure als Nukleophil unter Schutzgas bei 0 °C in THF umgesetzt. Auch hier konnte nicht das gewünschte Thioacetat **181** isoliert werden (s. Schema 54).



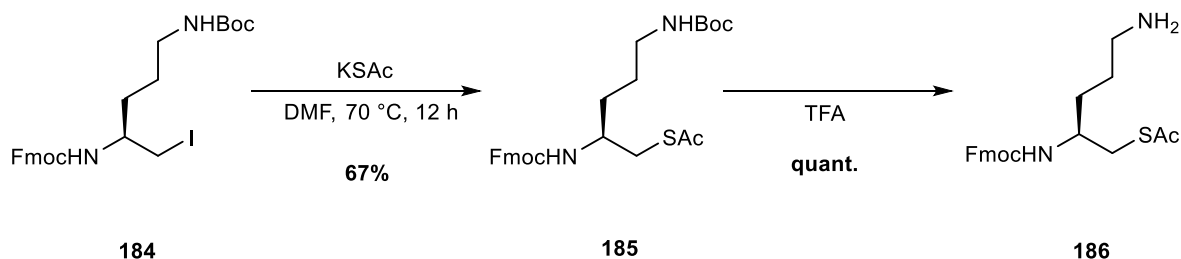
Schema 54: Versuche zur Umsetzung des Iodids **180** hin zum Thioacetat **181**. Sowohl bei der Umsetzung in einer S_N2-Reaktion mit Kaliumthioacetat (links) als auch in einer MITSUNOBU-Reaktion mit Thioessigsäure (rechts) konnte nicht das gewünschte Produkt isoliert werden.

Da beide Reaktionsführungen nicht zum gewünschten Produkt führten und der einzige Unterschied zu den zuvor beschriebenen Aminothiolen **164a, b** in der Harnstoffseitenkette des Citrullins liegt, sollte diese nach der Bildung des Thioacetates nachträglich eingeführt werden um etwaige Nebenreaktionen zu vermeiden. Hierzu wurde die Synthese ausgehend von Fmoc-L-Ornithin mit einer Boc-geschützten Seitenkette realisiert. Die ersten Stufen verlaufen hierbei analog zu den Synthesen der anderen, zuvor beschriebenen Aminothiolen (s. Kap. 3.3.1.5). Die Reduktion der Carbonsäure mit Natriumborhydrid konnte mit einer guten Ausbeute von 80% und die weitere Umsetzung zum Iodid in einer APPEL-Reaktion in 91% Ausbeute durchgeführt werden (s. Schema 55).



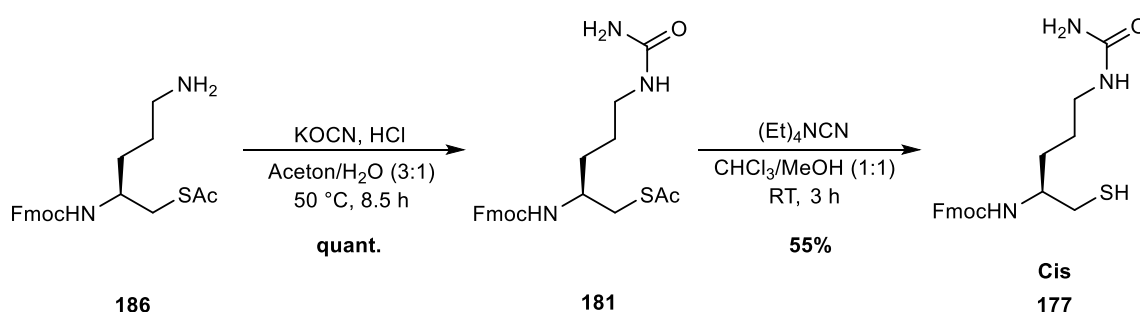
Schema 55: Reduktion von Fmoc-L-Ornithin **182** mit Natriumborhydrid durch Bildung des gemischten Anhydrids mit Ethylchlorformiat. Der gebildete Alkohol **183** wird in einer APPEL-Reaktion mit elementarem Iod in das Iodid **184** überführt.

Die zuvor beim Iodid mit Citrullinseitenkette **180** fehlgeschlagene Einführung des Thioacetates konnte beim Ornithinderivat **184** mit Kaliumthioacetat als Nukleophil in einer S_N2 -Reaktion in DMF bei 70 °C mit einer Ausbeute von 67% für **185** realisiert werden (s. Schema 56). Zur Einführung des Harnstoffs in der Seitenkette wurde zunächst die Boc-Schutzgruppe im Säuren mit TFA entfernt, um das freie Amin in der Seitenkette zu erhalten. Dies verlief quantitativ unter Erhalt von Verbindung **186**.



Schema 56: Umsetzung des Iodids **184** zum Thioacetat **185** in einer S_N2 -Reaktion mit Kaliumthioacetat und der anschließenden Entschützung der Boc-Schutzgruppe mit TFA zur Freisetzung des Amins in der Aminosäureseitenkette.

Arbeiten von MAKHOVA *et al.* konnten zeigen, dass primäre Amine von Aminosäuren und Aminoalkoholen in Gegenwart von Kaliumcyanat in den entsprechenden Harnstoff überführt werden können.^[289] Um das Löslichkeitsproblem des Fmoc-geschützten Bausteins **186** unter den von MAKHOVA beschriebenen Reaktionsbedingungen in reinem Wasser zu umgehen, wurde die Reaktion in einem 3:1 Gemisch aus Aceton und Wasser bei 50 °C durchgeführt. Der Harnstoff **181** konnte auf diese Weise in quantitativen Ausbeuten als farbloser Feststoff erhalten werden (s. Schema 57). Um den Citrullin-Baustein **181** in der Festphasenpeptidsynthese einsetzen zu können wurde das Thioacetat selektiv mit Tetraethylammoniumcyanid gespalten (vgl. Schema 27) und das freie Thiol **177** (Cis) analog zu Schema 52 an das 2-CTC-Harz gebunden.



Schema 57: Umsetzung des primären Amins **186** mit Kaliumcyanat zur Bildung des Fmoc-geschützten Citrullinderivates **181**. Die selektive Spaltung des Thioacetates erfolgte mit Tetraethylammoniumcyanid unter Erhalt des freien Thiols **177**.

3.4.1.2 Synthese eines ligierten Foldon-Filaggrin-Hybridpeptides

Die Synthese, der zur Ligation der Foldon-Filaggrin-Hybridpetide nötigen Peptideinzelstränge, wurde ausgehend von den vorbeladenen 2-CTC-Harzen mit Hilfe des mikrowellenunterstützten Peptidsynthesizers LIBERTY BLUE (CEM) in einem 0.10 mM Ansatz durchgeführt. Beide Einzelstränge (s. Tabelle 24) wurden ohne weitere Aufreinigung in der STL eingesetzt.

Tabelle 24: Sequenzen der Einzelstränge und des ligierten Foldon-Filaggrin-Hybridpeptides im Vergleich mit dem Hybridpeptid **96**.

Peptid	N-Term	<i>i</i>	<i>i</i> +1	<i>i</i> +2	<i>i</i> +3	C-Term
96	KQAYVR	Lys	Cit	Gly	Glu	WVLLSTFL
187	KQAYVR	Lys	Cis			
169				Mal	Gly	WVLLSTFL
188	KQAYVR	Lys	Cis	Suc	Gly	WVLLSTFL DS1/DS2

Das ligierte Peptid **188** wurde mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt und die beiden Diastereomere voneinander getrennt. Die Auswertung der NMR-Spektren beider Diastereomere zeigte, dass in beiden Fällen keine Sekundärstruktur ausgebildet wird. Weiterhin konnten beide Diastereomere nur in einer akzeptablen Reinheit isoliert werden, da andere Nebenprodukte während der präparativen Aufreinigung koeluierten. Die Auswertung des TOCSY-NMR-Spektrums des ersten Diastereomers des Hybridpeptides **188-DS1** ergibt eine Faltungspopulation von nur 2%, womit das Peptid eine *random coil* Struktur annimmt.

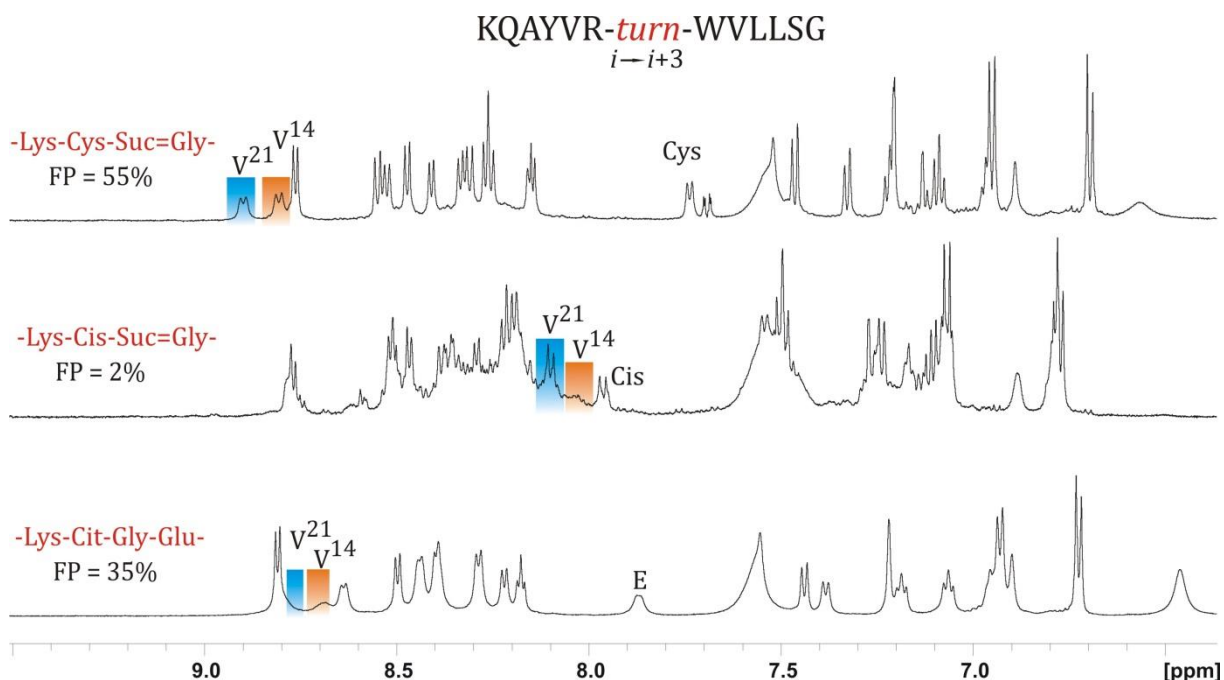


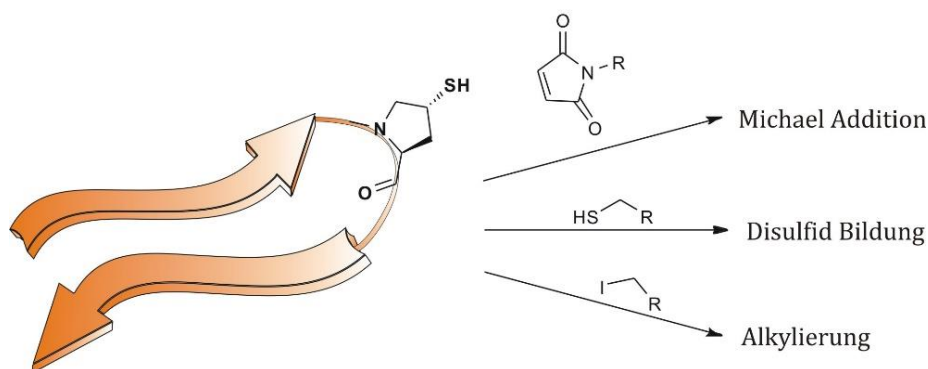
Abbildung 74: ^1H -NMR-Spektrum (600 MHz, 300 K, 50 mm Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0) des ligierten Filaggrin-Foldon-Hybridpeptides **188-DS1** (Mitte) im Vergleich mit dem ligierten „nativen“ Foldon β -hairpin **121-DS1** (oben) und dem chimären L-Citrullin Peptid **102** (unten).

Es konnte gezeigt werden, dass mit Hilfe der STL Filaggrin-Foldon-Hybridpeptide aufgebaut und auch beide entstehenden Diastereomere voneinander getrennt werden können. Jedoch konnte durch das Einführen des L-Citrullinthiol-Bausteins an der *i*+1-Position des hybriden Foldon β -hairpins **188-DS1/DS2**, wie schon beim Einbau des L-Citrullins in das chimäre Peptid **102** keine Ausbildung einer Sekundärstruktur beobachtet werden (s. Abb. 74). Nähere Auswertung der Faltungspopulation belegen, dass im Falle des ligierten Peptides **188** eine *random coil* Struktur vorliegt, wohingegen bei Peptid **102**, noch eine Vorzugskonformation des β -hairpins mit einem Faltungsgrad von 35% nachweisbar ist. Dieser Befund ist jedoch für den Einsatz in biologischen Tests nicht als negativ zu bewerten, da die bereits in den ELISA-Test angewandten Peptide cfc1 **172** und cfc1-cyc **173** ebenfalls sehr flexible Strukturen darstellen und als *random coil* Struktur in Lösung vorliegen. Zur Verifizierung einer biologischen

Aktivität gegenüber einer Autoantikörpererkennung für die RA wurden die beiden Hybridpeptide **188-DS1** und **188-DS2** in einem ELISA-Test untersucht. Hier zeigte sich, dass diese genau wie schon die vorangegangenen Foldonhybride **102**, **103** und **176** keine Affinität gegenüber den RA-Antikörpern aufwiesen. Dennoch bietet diese Methode einen neuen Ansatz zum Aufbau von Peptid epitopen in Nachbarschaft zu der unnatürlichen, isosteren Dipeptideinheit Suc=Xaa. Auch die in Kapitel 3.3.2.1 beschriebene pH-abhängige Hydrolyse des Succinimides kann eine ebenso pH-abhängige Konformationsänderung des Epitops und dadurch wiederum eine Antikörpererkennung ermöglichen. Hierdurch eröffnen sich neue Möglichkeiten die Affinität schaltbar zu machen.

3.5 Synthese eines funktionalisierbaren Foldon- β -hairpins

In den vorangegangenen Kapiteln wurden Methoden zum Aufbau von β -hairpins durch die Reaktion von Peptiden mit C-terminalen Thioaminosäuren mit N-terminalen Maleimid-Peptiden unter Ausbildung eines Succinimid-Thioethers beschrieben. Weiterhin sollte untersucht werden, ob mit den hier erarbeiteten neuen synthetischen Zugängen zu unnatürlichen Thioaminosäuren eine Synthese von funktionalisierbaren β -turns realisiert werden kann. Da sich β -turns meist an der Oberfläche von Proteinen befinden und Thiole sich durch ihre hohe Reaktivität auszeichnen, bietet der Ansatz eine interessante Methode zur posttranslationalen Modifikation von β -hairpins. Im besonderen Fokus standen dabei die in Kapitel 3.3.1.3.2 beschriebenen 4-Mercapto-L-prolin-Derivate **127** und **128**. Wie bereits in Kapitel 3.1 erwähnt, besitzt die Dipeptideinheit aus D-Phenylalanin und L-Prolin β -turn induzierende Eigenschaften. Daher sollte untersucht werden, ob durch das Einführen einer D-Phenylalanin- L-Mercaptoprolin-Dipeptideinheit an der $i+1$ und $i+2$ -Position des β -turns des isolierten Foldon β -hairpins ebenfalls die Sekundärstruktur stabilisiert werden kann und posttranslationale Reaktionen am Thiol durchgeführt werden können (vgl. Schema 58).



Schema 58: Möglichkeiten zur Funktionalisierung eines Foldon β -hairpins mit einem D-Phe-Thp β -turn.

3.5.1 Vergleich von Foldon- β -hairpins mit Prolinderivaten an der $i+2$ -Position des β -turns

Bereits die frühen Arbeiten von WÜTHRICH *et al.* konnten zeigen, dass D-Aminosäuren in N -terminaler Nachbarschaft zum Prolin eine Verringerung des *cis*-konfigurierten Amids zur Folge haben. Dieser Effekt wird durch eine Veränderung des verfügbaren konformativen Raums für die *trans*-Amidbindung hervorgerufen.^[290,291] Hierdurch ergibt sich für das D-Xaa-L-Pro Strukturmotiv eine Bevorzugung der *trans*-Konfiguration gegenüber des *cis*-Isomers mit $\sim 9:1$ und liefert somit die Erklärung für die *turn*-induzierenden Eigenschaften.^[291] Weiterhin hat neben der benachbarten Aminosäure zum Prolin auch der Pyrrolidinring selbst einen Einfluss auf die Konfiguration der Amidbindung und somit auf die Stabilität der eingenommenen Sekundärstruktur. Besonders bei Prolinderivaten, die an der γ -Position (4-Position) des Pyrrolidinringes substituiert sind, manifestiert sich die stereospezifische Abhängigkeit des Puckerings und die damit einhergehende Beeinflussung der *cis-trans*-Isomerie der Amidbindung um den Torsionswinkel ω . So stabilisiert ein *exo*-Puckering eine *trans*-Amidbindung, wohingegen ein *endo*-Puckering stark von einer *cis*-Amidbindung bevorzugt wird.^[254,259,292] Um den Einfluss von D-Phenylalanin-L-Xaa-Dipeptideinheiten (Xaa = Pro, Hyp, Thp) auf die Sekundärstruktur erstmals in einem vergleichbaren Modellsystem näher untersuchen zu können, wurden die Foldon β -hairpins (**189**, **190-191**^[293]) synthetisiert und mittels NMR-Spektroskopie verglichen. Eine Besonderheit dieser Peptide ist die Ausbildung eines β II'-turns mit L-Prolin an der $i+2$ -Position. WISHART *et al.* konnte zeigen, dass bei einer D-Tyr-L-Pro Dipeptideinheit innerhalb eines β II'-turns elektrostatische Anziehungskräfte zwischen den Partialladungen des aromatischen Systems und des Pyrrolidinringes, sowie VAN DER WAALS Kräfte eine Stabilisierung der *cis*-Amidbindung auftritt und somit ein gegenteiliger Effekt zu den von WÜTHRICH beschriebenen Ergebnissen beobachtet wurde.^[294] Um weiterhin eine Aussage über den Einfluss des *gauche*-Effekts (vgl. Kap. 3.3.1.3.2) von $C\gamma$ -substituierten Prolinderivaten auf die Sekundärstruktur machen zu können, galt dem 4*R*-konfiguriertem Mercaptoprolinderivat ein besonderes Interesse, da es sich invers zu dem natürlich vorkommenden (4*R*)-Hydroxyprolin verhält. So wird von dem 4*R*-Mercaptoprolin ein *endo*-Puckering und von dem (4*R*)-Hydroxyprolin ein *exo*-Puckering bevorzugt.^[254] Zusammen mit den von WISHART beschriebenen Ergebnissen zur Ausbildung einer *cis*-Amidbindung des D-Tyr-L-Pro-Strukturmotivs lässt sich daher eine Bevorzugung des (4*R*)-Mercaptoprolin β -hairpin **189** gegenüber dem (4*R*)-Hydroxyprolin β -hairpin **190** erwarten. Im Vergleich der ¹H-NMR-Spektren aller D-Phe-Xaa β -hairpins **189-191** zeigt sich bereits in der Dispersion des amidischen Bereichs eine klare Tendenz in Abhängigkeit des Puckerings (s. Abb. 75) und bestätigt diese Annahme.

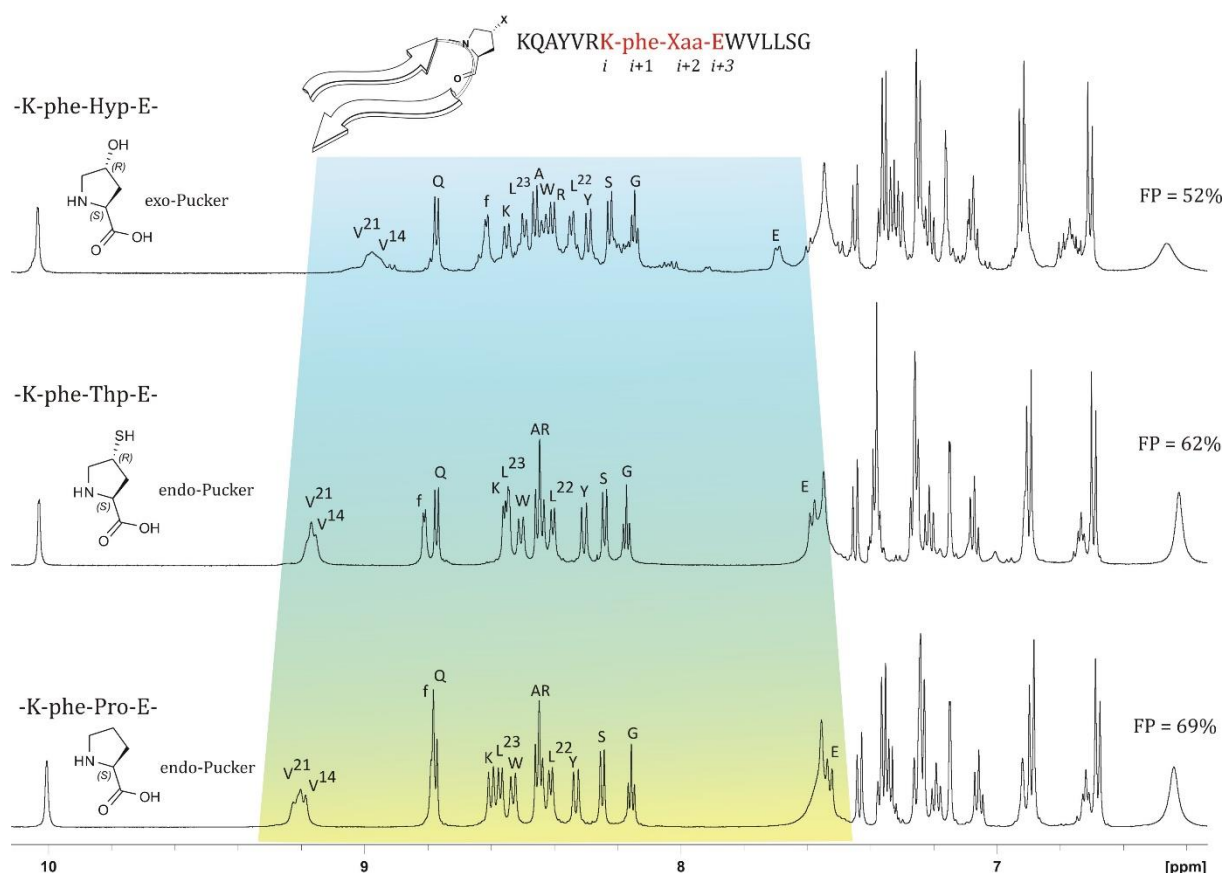


Abbildung 75: Vergleich der ¹H-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/D₂O (11:1), pH = 3.0) im amidischen Bereich der Foldon β -hairpin Mutanten mit Prolinderivaten an der *i*+2-Position (**189-191**) des β -turns. Zu erkennen ist der Einfluss des Puckering der Prolinderivate auf die Dispersion im Amidbereich und die Faltungspopulation.

So weisen die beiden β -hairpins **189** und **190** mit einem *endo*-Puckering eine höhere Dispersion und damit auch höhere Faltungspopulationen im Vergleich zu **191** mit *exo*-Puckering auf. Auch die charakteristische Tieffeldverschiebung der Valin-Amidprotonen des Foldon β -sheets ist bei dem β -hairpin **191** mit dem *exo*-Puckering beinhaltenden D-Phe-Hyp-Dipeptid drastische reduziert und deutet auf eine Destabilisierung der Sekundärstruktur hin. Die höheren Faltungspopulationen der Foldon β -hairpins **189** und **190** mit einem *endo*-Puckering an der *i*+2-Position kann nur durch das Arrondieren des *gauche*-Effekts in Kombination mit einer stabilisierten *cis*-Amidbindung erklärt werden, da bei einem *endo*-Puckering an dieser Position ein destabilisierender Effekt auf die Sekundärstruktur zu erwarten ist. Dieser tritt hier jedoch bei dem β -hairpin mit *exo*-Puckering auf. Somit stehen diese Ergebnisse im guten Einklang mit dem von WISHART beschriebenen Effekt des D-Tyr-L-Pro Strukturmotivs, das durch die Wechselwirkungen des aromatischen Systems mit dem Pyrrolidinring eine *cis*-Amidbindung ausbildet und stabilisiert wird. Durch diese ungewöhnliche Kombination der stabilisierenden Effekte konnte gezeigt

werden, dass sich das Strukturmotiv D-Phe-Thp innerhalb eines β II'-turns sehr gut zum Aufbau eines potentiell funktionalisierbaren Foldon β -hairpins eignet.

3.5.2 Michael-Addition des 4(R)-Mercapto-L-prolin β -turn mit einem Maleimid-Tetrapeptid

Nachdem gezeigt werden konnte, dass unter Verwendung des Thp-Bausteins ein nativ faltender Foldon β -hairpin mit einer relativ hohen Faltungspopulation von 62% dargestellt werden kann, sollte dieser auf seine Reaktivität und Funktionalisierbarkeit im Rahmen einer thio-MICHAEL-Addition hin untersucht werden. Hierzu wurde das Maleimid-Tetrapeptid Mal=Gly-Val-Gly **114** unter den Standardbedingungen der zuvor beschriebenen STL mit dem β -hairpin **189** umgesetzt. Nach der Aufreinigung des Adduktes **192** wurde dieses mittels NMR-Spektroskopie analysiert. Anhand der Veränderung der chemischen Verschiebung des γ -Protons des Pyrrolidinrings sowie des Auftretens der diastereotopen Protonen der Succinimid- β -Protonen mit einem Signalverhältnis von 1:1 (s. Abbildung 76) ist der Beweis zusammen mit der HR-MS erbracht, dass die Ligation bzw. posttranslationale Modifikation des Foldon β -hairpins **189** über das Thiol des Thp-Bausteins erfolgreich durchgeführt werden kann.

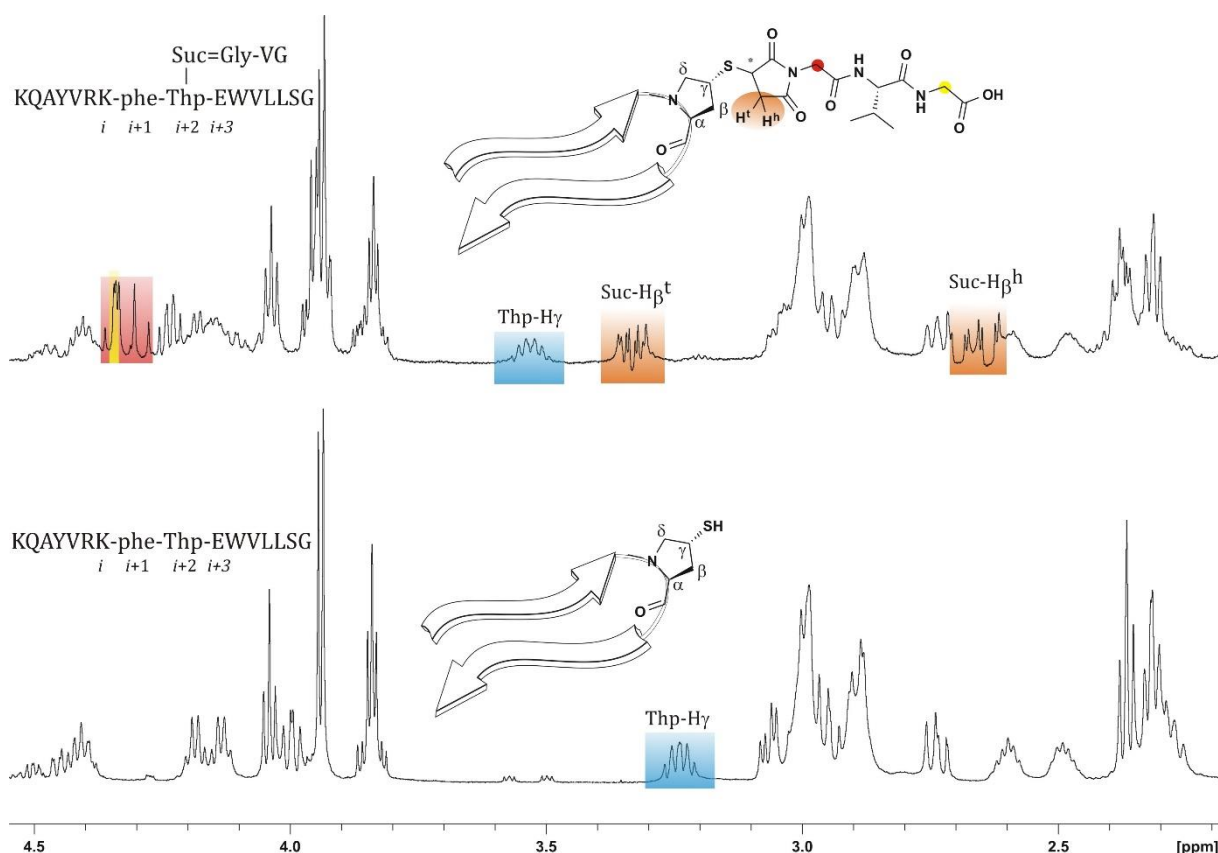


Abbildung 76: ^1H -NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mM Kaliumphosphatpuffer/ D_2O (11:1), pH = 3.0) des Thp-Foldon β -hairpins **189** vor der Ligation (unten) und nach der Ligation mit dem Maleimid-Tetrapeptid **192** (oben).

Ebenfalls positiv zu bewerten ist, dass sowohl der unmodifizierte β -hairpin **189** als auch das Additionsprodukt **192** identische Faltungspopulationen von 62% aufweisen. Durch diesen Befund kann bestätigt werden, dass durch die Addition des Tetrapeptides über das Thiol des Mercaptoprolins keine Beeinträchtigung der Sekundärstruktur hervorgerufen wird. Interessanterweise können hier auf Grund der Tatsache, dass sich der Succinimid-Ring nicht in einer konformativ eingeschränkten Umgebung befindet, wie es der Fall für die über die STL ligierten Foldon β -hairpins **121**, **129** und **157** mit einer nativen Faltung der Fall ist, die beiden Diastereomere nicht im RP-HPLC-Chromatogramm unterschieden werden. Auch im TOCSY-NMR-Spektrum sind die Signalsätze der beiden Diastereomere nur für einige wenige Protonen, wie die Succinimid- β -Protonen und den D-Phenylalanin-Rest, unterscheidbar. Hier sind die Unterschiede jedoch deutlich geringer als bei den zuvor beschriebenen, nicht trennbaren Diastereomeren des Lst-Peptides **166** (Kap. 3.3.1.5) und des ThT-Peptides **130** (Kap. 3.3.1.3.1).

3.5.3 Dimerbildung des Thp-Foldon β -hairpins

Da Peptide mit einem freien Thiol bei geeigneter Konzentration und geeignetem pH-Wert zur Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken neigen, sollte neben der Möglichkeit zur Funktionalisierung über eine thio-MICHAEL-Addition auch die Dimerbildung des Thp-Foldon β -hairpins **189** untersucht werden. Unter den Messbedingungen für die NMR-Spektroskopie in einem 50 mM Kaliumphosphatpuffer bei einem pH-Wert von 3.0 wurde über einen Zeitraum von 24 Stunden keine Dimerisierung des Peptides beobachtet. Daher wurde in einem weiteren Experiment das Peptid in einem Ammoniumacetatpuffer mit einem pH-Wert von 8.4 unter Anwesenheit von Luftsauerstoff gerührt und die Reaktion mittels RP-HPLC verfolgt. Nach 12 Stunden konnte unter diesen Bedingungen bereits ein vollständiger Umsatz festgestellt werden. Unter Zugabe von Wasserstoffperoxid wird die Oxidation stark beschleunigt und erreicht bereits nach zwei Stunden einen vollständigen Umsatz. Bei der Dimerbildung des β -hairpins **189** können zwei Fälle in Betracht gezogen werden: Zum einen besteht die Möglichkeit, dass sich ein symmetrisches Dimer ausbildet und hierdurch die Signalsätze für beide Stränge im NMR-Spektrum nicht unterschieden werden können. Dies wurde bereits in der Arbeitsgruppe GEYER bei der Oxidation von disulfidreichen 12er β -hairpins des Filaggrins unter Ausbildung eines Bidisulfides zwischen zwei hairpin-Unterheiten beschrieben.^[295] Ein weiterer Fall, der berücksichtigt werden sollte, ist die Ausbildung eines unsymmetrischen Dimers, in dem beide Stränge eine eigene Konformation einnehmen und voneinander unterscheidbare chemische Verschiebungen im ^1H -NMR-Spektrum

aufweisen. Auch hierfür wurden bereits Fälle in der Literatur beschrieben.^[296] Um die Struktur des Dimers **193** aufzuklären, wurde das Produkt nach der Oxidation mittels präparativer RP-HPLC aufgereinigt und NMR-spektroskopisch untersucht sowie mittels HR-MS charakterisiert. Hier zeigte sich bereits im ¹H-NMR-Spektrum, dass der letztere Fall eines unsymmetrischen Dimers zutrifft (s. Abbildung 77).

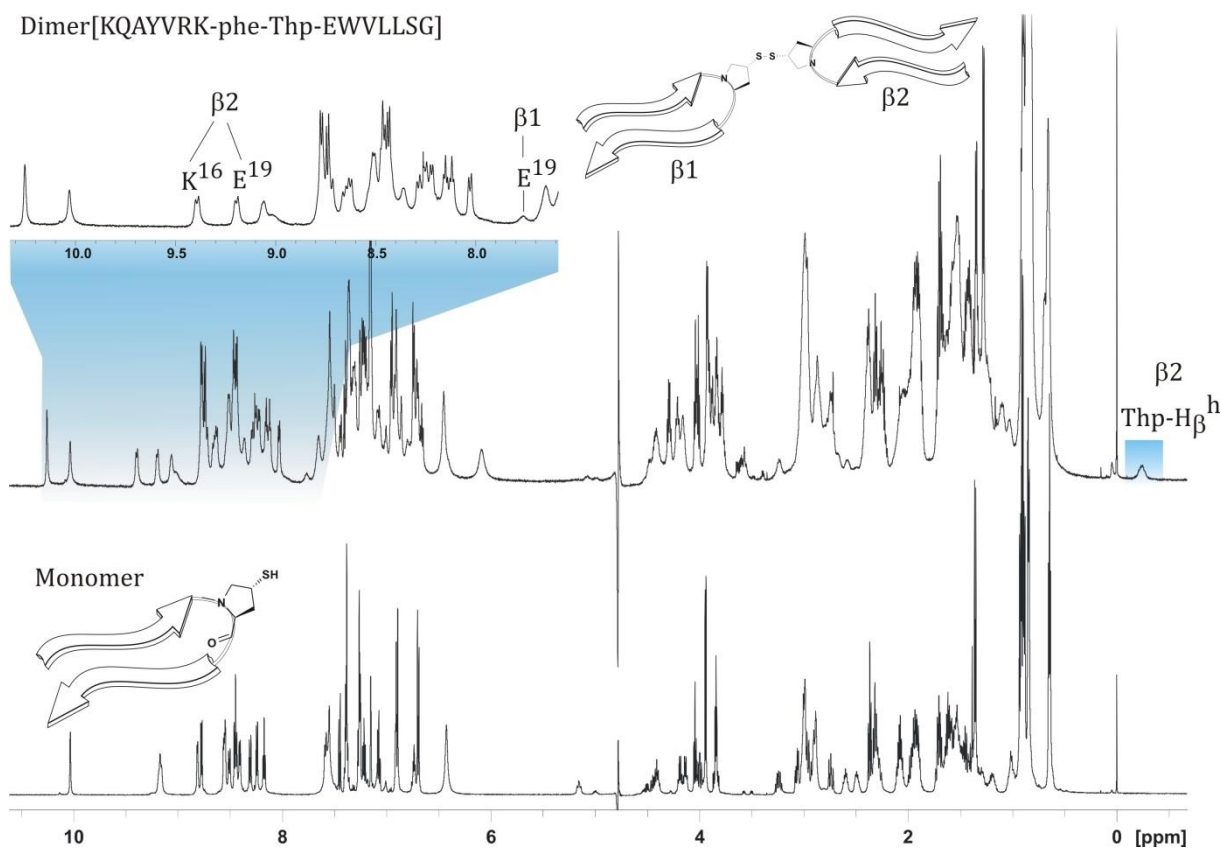


Abbildung 77: Vergleich der ¹H-NMR-Spektren (600 MHz, 300 K, 50 mm Kaliumphosphatpuffer/D₂O (11:1), pH = 3.0) des Thp-Foldon β -hairpin Monomers **189** (unten) mit dem durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke entstandenen Dimer **193** (oben). Die Oxidation von **189** führt zu einem unsymmetrischen Dimer, in dem beide Stränge unterschieden werden können und unterschiedliche Faltungspopulationen von 52% ($\beta 1$) bzw. 24% ($\beta 2$) aufweisen.

Interessant hierbei ist, dass ein β -hairpin des Dimers nahezu identische chemische Verschiebungen zum Monomer aufweist, wohingegen der zweite Strang eine gänzlich andere Konformation einnimmt. Die Faltungspopulation der beiden β -hairpins des Dimers verdeutlicht diesen Sachverhalt. So liegt diese für den $\beta 1$ -Strang bei 52% und für den $\beta 2$ -Strang nur bei 24%. Insgesamt betrachtet hat die Dimerisierung in diesem Fall einen destabilisierenden Einfluss auf die Sekundärstruktur der jeweiligen Monomer-Untereinheiten. Besonders dramatisch fällt dieser Einfluss, wie zu erwarten auf die *turn*-Region der β -hairpin Einheiten aus. So weist das normalerweise im Foldon β -hairpin am stärksten abgeschirmte Amidproton von Glu¹⁹ an der *i*+3-Position des β -turns im $\beta 2$ -Strang eine extreme Tieffeldverschiebung auf. Diese

liegt noch über den der Valin-Amidprotonen des $\beta 1$ -Stranges. Dennoch korreliert die Faltungspopulation beider Stränge, genau wie bei den ligierten Peptiden in Kap. 3.3.1.4.2 beschrieben, mit den chemischen Verschiebungen der Valin-NH und weist einen linearen Zusammenhang auf (vgl. Abbildung 63). Eine weitere bemerkenswerte Charakteristik des Dimers **193** zeigt sich in der ungewöhnlich starken Hochfeldverschiebung des Thp- H_{β^h} des $\beta 2$ -Stranges. Diese kann durch einen stark ausgeprägten Ringstromeffekt des benachbarten Phenylalanins des $\beta 1$ -Stranges erklärt werden.^[294] Dieser wird durch die räumliche Nähe der beiden Dipeptideinheit bestehend aus D-Phe und Thp nach der Dimerisierung möglich. Hierdurch werden die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem Phenylring und dem Pyrrolidinring des Thp verstärkt, die bereits im Monomer zur Stabilisierung der *cis*-Amidbindung beitragen.^[294] Jedoch scheint im Falle des $\beta 2$ -Stranges der stark eingeschränkte konformative Raum des Pyrrolidinrings einen destabilisierenden Einfluss auf die restliche Sekundärstruktur zu haben, die sich in der stark verringerten Faltungspopulation manifestiert. Da zwei Signalsätze im ^1H -NMR-Spektrum erhalten werden, und es sich bei **193** um eine C_2 -Symmetrische Verbindung handelt, muss weiterhin berücksichtigt werden, dass der zweite Signalsatz durch ein Gleichgewicht zwischen unterschiedlichen, unterscheidbaren Spezies des Dimers hervorgerufen werden kann (s. Abb. 78). So kann ein schnelles Gleichgewicht zwischen dem vollständig gefalteten und entfalteten Dimer ebenso zu einem NMR-Spektrum mit zwei Signalsätzen führen, wie es ein unsymmetrisches Dimer zur Folge hätte.

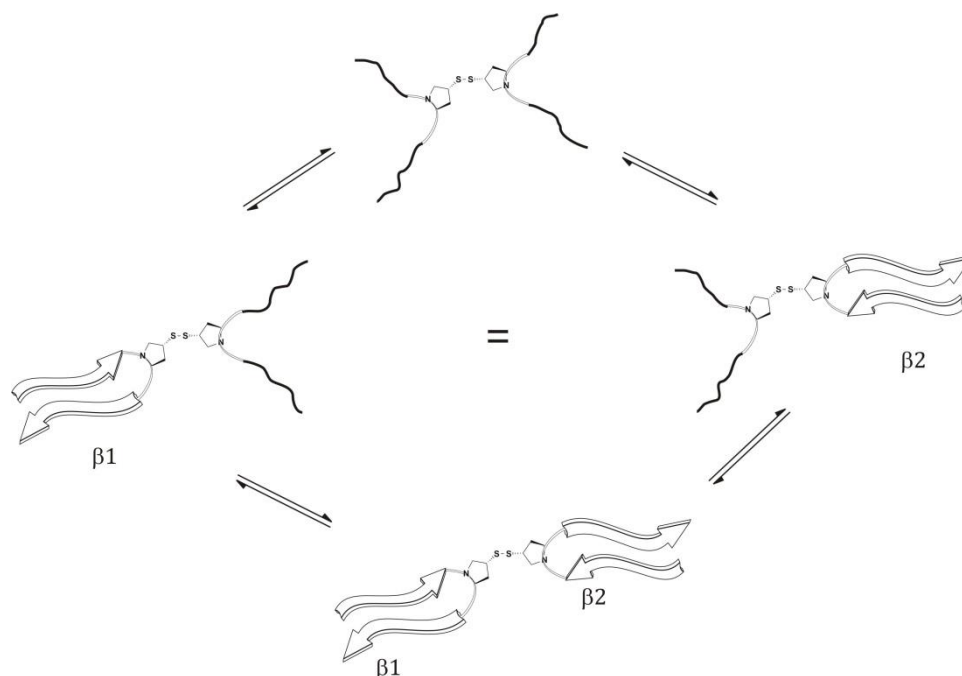


Abbildung 78: Durch das Auftreten zweier Signalsätze im ^1H -NMR-Spektrum kann es sich bei **193** nicht nur um ein unsymmetrisches Dimer handeln sondern ein Gleichgewicht zwischen den vier möglichen Strukturen formuliert werden. Diese muss in Folgeexperimenten mittels temperaturabhängiger NMR-Spektroskopie noch überprüft werden.

Um dieser Hypothese nachzugehen müssen temperaturabhängige NMR-Messungen als Folgeexperiment durchgeführt werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr vorgenommen wurden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass eine Funktionalisierung über die D-Phe-Thp-Dipeptideinheit unter Ausbildung eines Disulfids möglich ist, sowie einen einfachen Weg zur Darstellung von Dimeren ermöglicht. Besonders interessant ist hierbei die Möglichkeit zum Aufbau von Heterodimeren mit unterschiedlichen β -hairpins oder auch der Funktionalisierung mit diversen Thiolen, die wiederum eine funktionelle Gruppe tragen.

Weiterhin konnte anhand der in Kapitel 3.5 vorgestellten Experimente gezeigt werden, dass insbesondere der (4*R*)-Mercapto-L-prolinbaustein **127**, dessen Synthese im Rahmen dieser Arbeit entwickelt wurde, eine äußerst interessante Möglichkeit zur Darstellung von *turn*-funktionalisierbaren β -hairpins darstellt. Weiterhin eröffnet dieser Baustein nicht nur die Möglichkeit zur Synthese von *hairpin*-Peptiden, sondern auch von PPII-helikalen Strukturen. Ein besonderer Fokus sollte hier auf die Synthese von Kollagen-Derivaten gelegt werden. Durch die Einführung des 4-Mercaptoprolins in die repetitiven PUG-Einheit dieses natürlich vorkommenden Biopolymers kann eine Vernetzung der Tripelhelix ermöglicht oder ebenfalls eine regioselektive, posttranslationale Modifikation mittels thio-MICHAEL-Addition durchgeführt werden. Somit liefern die hier erarbeiteten Synthesen und daraus gewonnene Erkenntnisse einen interessanten Startpunkt für weitere Forschung.

4. Zusammenfassung

Die regioselektive thio-MICHAEL-Addition von Maleimiden mit einem Thiol unter Ausbildung eines Succinimid-Thioethers ist eine weit verbreitete Methode zur Konjugation von Biomolekülen oder zur Funktionalisierung von Oberflächen. Besonders in der medizinischen Chemie ist ein wachsendes Interesse zu beobachten, da auf diese Weise ein einfacher Zugang zu Antikörperkonjugaten oder radiogelabelten Peptiden zur Krebsdiagnostik möglich wird. Jedoch wurde bisher den beiden möglichen Diastereomeren des Succinimid-Ringes keine Aufmerksamkeit geschenkt. Dies ist verwunderlich, da in der Vergangenheit am Beispiel des Medikamentes THALIDOMID gezeigt werden konnte, dass ein einzelnes Stereozentrum einen entscheidenden Einfluss auf die pharmakologische Wirkung besitzt. Durch die Betrachtung des Succinimid-Thioethers als isosteres Strukturmotiv zu Aspartimiden/Aminosuccinimiden wurde im Rahmen dieser Arbeit erstmals der konformationelle Einfluss der unterschiedlichen Diastereomere unter Berücksichtigung des natürlich vorkommenden Peptidrückgratregister (-NH-C α -CO-) auf die globale Struktur von Peptiden mit Hilfe der NMR-Spektroskopie untersucht. Auf diese Weise wird eine Brücke zwischen der Biokonjugation und der nativen chemischen Ligation geschlagen. Durch die neuartige Anwendung des bereits etablierten Konzeptes der Biokonjugation durch die Reaktion von Maleimiden, konnte erfolgreich die Synthese von unterschiedlichen Peptidstrukturen mit einem Succinimid-Thioether innerhalb des Peptidrückgrates durchgeführt werden.

Basierend auf den vorangegangenen Arbeiten von GRANDAS *et al.* konnten durch die intramolekulare thio-MICHAEL-Addition zyklische Hexapeptide dargestellt werden, die es ermöglichten, den Einfluss der Stereochemie der C- und N-terminal zum Succinimid benachbarten Stereozentren sowie den beiden Diastereomeren des Succinimides selbst zu untersuchen. Die voneinander trennbaren Diastereomere der konformativ eingeschränkten zyklischen Hexapeptide wiesen dabei ein ungewöhnliches stereodynamisches Verhalten auf. Der zugrundeliegende Mechanismus für diese Epimerisierung konnte auf eine Enolisierung des Succinimid-Ringes mit einer einhergehenden 180° Rotation um die C-S-Bindung des Thioethers zurückgeführt werden. Durch Langzeit-NMR-Experimente konnte gezeigt werden, dass das thermodynamische Gleichgewicht der Epimerisierung zwischen den Diastereomeren DS1:DS2 immer bei einem Verhältnis von 3:1 liegt. Durch die Einführung von zusätzlichen Stereozentren entlang des Peptidrückgrates durch die Synthese von chiralen Maleimid-Dipeptidbausteinen sowie der unnatürlichen β -Thioamino-säure L-*allo*-Thiothreonin, konnte die Geschwindigkeit der Epimerisierung gesteuert und sogar vollständig unterdrückt werden. Diese Experimente belegten, dass Konformation des Peptides und insbesondere die Stereokonfiguration am Succinimid-Ring einen erheblichen Einfluss auf dessen C-H-Acidität besitzt.

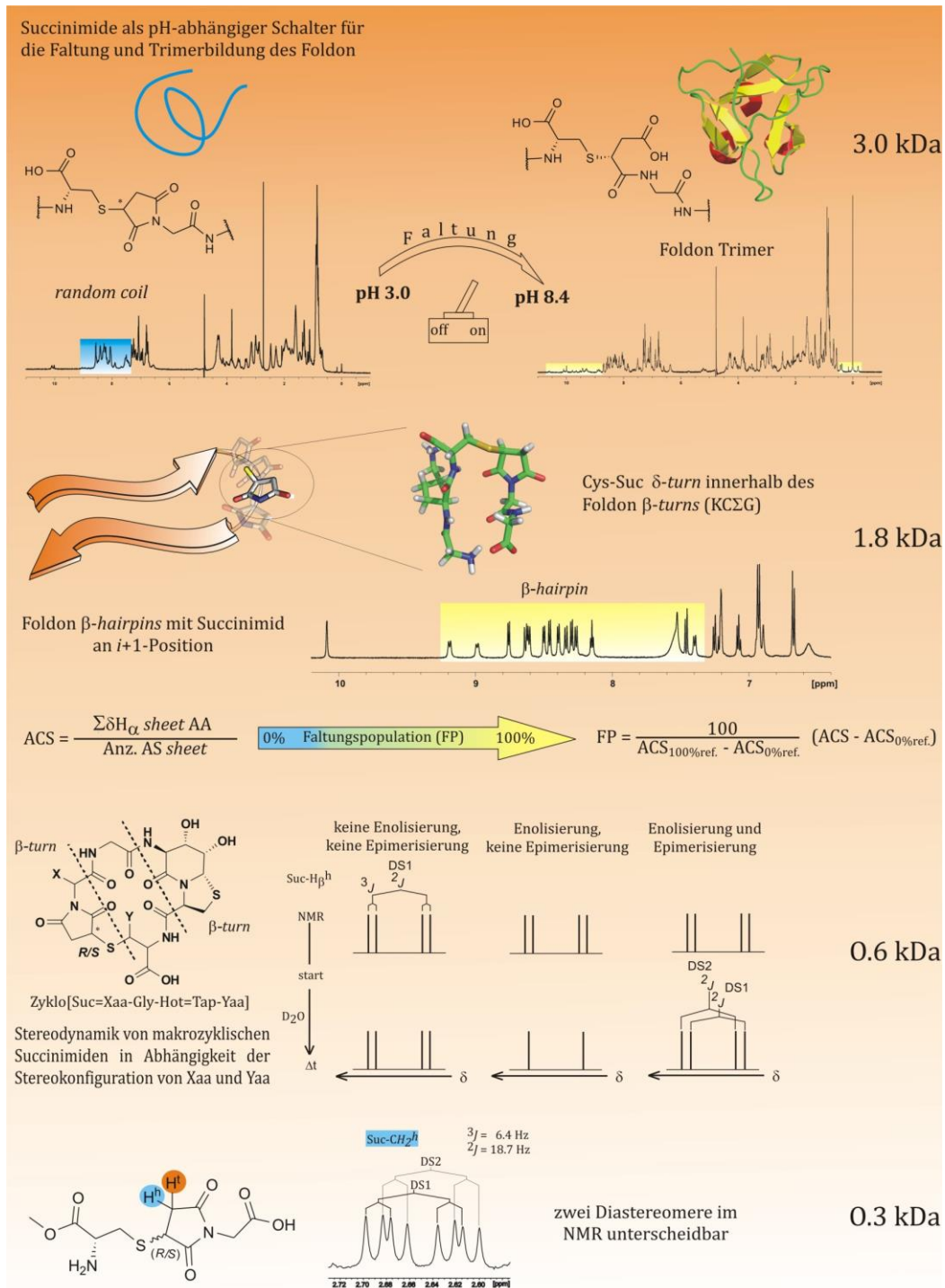


Abbildung 79: Zusammenfassung der konformationellen Einflüsse der Diastereomere der isosteren Succinimid-Thioether in unterschiedlichen Peptidstrukturen. Die Stereokonfiguration des Succinimides ist entscheidend für die konformative Stabilität der Peptide. In makrozyklischen Systemen führt dies zu einem stereodynamischen Verhalten, das über die benachbarten Stereozentren zum Succinimid-Ring gesteuert werden kann. In β -hairpins nimmt nur eines der Diastereomere des Succinimid-Thioethers die außergewöhnliche Geometrie eines δ -turns innerhalb des β -turns ein, das zu einer Stabilisierung der Sekundärstruktur führt. In der globulären Umgebung eines Proteins konnte das Succinimid durch Hydrolyse als pH-abhängiger Schalter für die Ausbildung einer Quartärstruktur genutzt werden.

Die Durchführung eines *Succinimid-Scans* in der β -turn-Region des isolierten Foldon β -hairpins ermöglichte die Identifizierung einer geeigneten Ligationstelle zum Aufbau von β -hairpin-Strukturen. So konnten, basierend auf den Ergebnissen des *scans*, in einer intermolekularen thio-MICHAEL-Addition zweier Einzelstränge, erfolgreich nativ faltende isolierte β -hairpins des Foldons mit einem Succinimid an der $i+2$ -Position des β -turns synthetisiert werden. Anhand dieser Peptide konnte die Konformation des Succinimides innerhalb des β -turns aufgeklärt werden. Die Analyse der NMR-spektroskopischen Daten zeigte, dass der Succinimid-Ring zusammen mit der Thioaminoäure die ungewöhnliche Geometrie eines δ -turns an der $i+1$ - und $i+2$ -Position einnimmt, der sich wiederum innerhalb des intakten β -turns befindet.

Mit Hilfe der erfolgreich im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode zur quantitativen Bestimmung einer Faltungspopulation von β -hairpins und β -Faltblattstrukturen, war es möglich, die Succinimid-Thioether beinhaltenden hairpins mit dem nativen Foldon β -hairpin zu vergleichen und bezüglich ihrer Stabilität zu bewerten. Bemerkenswert ist dabei die gesteigerte Faltungspopulation des Succinimid-Thioether β -hairpins mit L-*allo*-Thiothreonin im Vergleich zur nativen Sequenz. Dieses Beispiel zeigt, dass die thio-MICHAEL-Addition zwischen einem Maleimid und dem Thiol einer β -Thioaminoäure zum Aufbau von Peptiden genutzt werden kann und der Succinimid-Thioether sogar einen stabilisierenden Einfluss auf die Sekundärstrukturen hat. Interessanterweise wurde für die ligierten Foldon β -hairpins kein stereodynamisches Verhalten wie bei den zyklischen Hexapeptiden beobachtet. Hier manifestiert sich der Unterschied in der Stereokonfiguration des Succinimid-Ringes in einem Diastereomer, das in der Lage ist die native Faltung des Foldon hairpins einzugehen und einem Diastereomer, welches als *random coil* Struktur vorliegt und somit keine Vorzugskonformation aufweist.

Die Untersuchungen innerhalb der Proteinumgebung des Foldon-Miniproteins zeigten, dass Succinimid-Thioether an der $i+1$ - und $i+2$ -Position des zentralen β -hairpins durch ihren eingeschränkten konformativen Raum zu einer Destabilisierung der Tertiärstruktur führen. Durch eine gezielte Hydrolyse des Succinimides durch Erhöhung des pH-Wertes konnte die trimere Quartärstruktur ausgebildet werden. Somit kann der Succinimid-Thioether als pH-abhängiger Schalter zur Ausbildung einer Tertiär- oder Quartärstruktur genutzt werden.

5. Summary

The regioselective thio-MICHAEL addition of maleimides with thiols to form succinimide-thioethers is a well established method for bioconjugation and surface functionalization. This reaction enables the simple synthetic access to complex antibody drug conjugates (ADC) and radiolabelled peptides (e. g. for cancer diagnostics), thus possessing a high utility for medicinal chemistry purposes. So far, no real attention has been paid to the two possible diastereomers, formed at the succinimide-ring during the conjugation reaction. This is surprising in respect of extreme examples like THALIDOMIDE that revealed the importance of the correct stereoconfiguration for the intended pharmacological activity.

The utilization of using succinimide-thioethers within a peptide backbone under consideration of the native peptide backbone register ($-\text{NH}-\text{C}_\alpha-\text{CO}-$) and as an isosteric replacement for aspartimides allows deeper insights into the conformational influences of these diastereomers. The resulting influence on the global peptide structure is described in this work for the first time and was investigated by NMR spectroscopy. The versatile succinimide-thioether motif can either be employed for ligation purposes to build up larger structures and/or for subsequent bioconjugation applications (comparable to the widely used NCL).

Based on the previous work by GRANDAS *et al.* macrocyclic hexapeptides could be synthesized by intramolecular thio-MICHAEL addition. These peptides allowed the investigation of the influence of the stereocenters neighboring the succinimide ring (N- and C-terminal) as well as of the succinimide's stereocenter itself. The diastereomers of the constrained macrocyclic hexapeptides, which are separable by preparative HPLC (DS1/DS2), revealed a stereodynamic behavior. This epimerization was attributed to the enolization of the succinimide ring coinciding with a 180° rotation around the C-S bond of the thioether. Long-term NMR studies showed that the thermodynamic equilibrium of this epimerization reached at a ratio of 3:1 (DS1:DS2). Further examinations yielded evidence that the epimerization can be controlled in its velocity or completely suppressed by introducing additional stereocenters to the peptide backbone. The latter was accomplished by the synthesis of chiral maleimide building blocks and the unnatural β -thioamino acid L-*allo*-thiothreonine. These experiments prove that the conformation of the macrocyclic hexapeptide ring and especially the stereoconfiguration of the succinimide ring have a significant influence on the C-H acidity of the succinimide.

To investigate the succinimide-thioether motif within a hairpin structure, a succinimide scan was performed on the isolated Foldon β -hairpin as a model system. This scan revealed that peptide ligation should be conducted between the i+1 and i+2 position of the β -turn to obtain an optimal β -hairpin fold. The intermolecular thio-MICHAEL addition of two separate peptide strands always

resulted in two diastereomers of the Foldon β -hairpin with a succinimide ring at the $i+2$ position. It could be shown that only one of these diastereomers exhibited a native fold. With these peptides it was possible to determine the turn geometry adopted by the succinimide-thioether. The NMR spectroscopic data revealed, that the succinimide ring together with the thioamino acid occupies a unique δ -turn at the $i+1$ and $i+2$ position within the intact β -turn of the Foldon β -hairpin. With the aid of an independently developed NMR based method for determining the quantitative folding population of secondary structures it was possible to compare the succinimide containing hairpins regarding their conformational stability with the native Foldon β -hairpin. Remarkably, the folding population of the hairpin was increased by using *L-allo*-thiothreonine in comparison to the native Foldon hairpin. These experiments show that the thio-MICHAEL addition between a maleimide and a thiol can be used to build up and also stabilize secondary structures. Interestingly the stereodynamic behaviour observed within the macrocyclic hexapeptides did not occur in the ligated Foldon β -hairpins.

Further investigations within the protein environment of the Foldon mini protein showed that succinimide-thioethers at the $i+1$ and $i+2$ position of the central β -hairpin of this protein had a destabilizing effect on the tertiary structure due to increased rigidity of the succinimide containing β -turn. However the succinimide-thioether can be systematically hydrolyzed, thereby decreasing the rigidity of the system thus serving as a pH-dependent switch for the folding of tertiary and in the case of the Foldon quaternary structures.

6. Experimenteller Teil

6.1 Allgemeines

Synthese und Lösungsmittel

Alle synthetischen Arbeiten mit luft- und/oder wasserempfindlichen Substanzen wurden nach der *Schlenk*-Technik unter Inertgasatmosphäre in ausgeheizten Gefäßen durchgeführt. Die dabei eingesetzten Lösungsmittel wurden vor der Verwendung über Natrium/Benzophenon (Tetrahydrofuran, Diethylether) oder Calciumhydrid (Dichlormethan) getrocknet und unter einer Stickstoffatmosphäre destilliert. Alle weiteren Lösungsmittel sowie Laufmittel für die Säulenchromatographie wurden am Rotationsverdampfer destilliert. DMF für die Peptidsynthese sowie *Fmoc*-geschützte Aminosäuren wurden von *Iris Biotech* kommerziell erworben.

Kernresonanzspektroskopie

Die NMR-Spektren wurden von den Mitarbeitern der NMR-Abteilung an den Geräten *Bruker Avance 300* (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75.5 MHz), *Bruker DPX 250* (^1H : 250 MHz, ^{13}C : 62.5 MHz), *Bruker Avance DRX 500* (^1H : 500.13 MHz, ^{13}C : 125.75 MHz), *Bruker Avance AV 500* (^1H : 500.13 MHz, ^{13}C : 125.75 MHz) und *Bruker Avance AV 600* (^1H : 600.13 MHz, ^{13}C : 150.90 MHz) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen δ sind in parts per million (ppm) angegeben und wurden aus der Mitte des Kopplungsmusters abgelesen. Für Multipletts wurde der Bereich, in dem das Signal erscheint, angegeben. Die Kopplungskonstanten sind in Hertz (Hz) angegeben und wurden aus Lorentz-zu-Gauß transformierten ^1H -NMR-Spektren abgelesen. Die Proben wurden, wenn nicht anderweitig angegeben, bei einer Standardtemperatur von 300 K gemessen. Als interner Standard zum Kalibrieren der Spektren diente das Restprotonensignal des verwendeten deuterierten Lösungsmittels (DMSO- d_6 : ^1H : δ = 2.50 ppm; ^{13}C : δ = 39.52 ppm; CDCl_3 : ^1H : δ = 7.26 ppm; ^{13}C : δ = 77.16 ppm). Bei Messungen in 50 mM Phosphatpuffer (pH = 3.0, 5.0, 7.0) und Deuteriumoxid (11:1) wurde als interner Standard 3-(Trimethylsilyl)-propionsäure- d_4 zugesetzt und in den Spektren auf ^1H : δ = 0.00 ppm kalibriert. Die Angaben in Bezug auf die Signalform sind phänomenologisch, d.h. sie entsprechen dem Erscheinungsbild des jeweiligen Signals und nicht der theoretisch erwartenden Multiplizität. Die Signalaufspaltungen wurden mit den Abkürzungen *s* (Singulett), *bs* (breites Singulett), *d* (Dublett), *t* (Triplett), *dd* (Dublett

vom Dublett), *ddd* (doppeltes Dublett vom Dublett), *dt* (Dublett vom Triplett), *q* (Quartett) und *m* (Multiplett) angegeben. Diasterothoprotone wurden mit den Indizes ^t für das tieffeldige bzw. ^h für das hochfeldige Proton bezeichnet. Konnte eine genaue stereochemische Zuordnung getroffen werden, wurde diese mit *proR* und *proS* gekennzeichnet. Zur Zuordnung der Signale in ¹H- und ¹³C-NMR Spektren wurden COSY-, HSQC- und HMBC- 2D-Spektren aufgenommen. Zur weiteren Strukturaufklärung wurden ROESY- und NOESY- Spektren aufgenommen.

Massenspektrometrie

Die Aufnahme der Massenspektren erfolgte durch Mitarbeiter der massenspektrometrischen Abteilung an folgenden Geräten: für ESI-Massenspektren: *Fisher Thermo Scientific LTQ-FT*, HPLC-ESI-MS-Messungen wurden an einer *Agilent 1100 HPLC* durchgeführt, die mit einem *Fisher Thermo Scientific LTQ-FT* Spektrometer gekoppelt war. Als Laufmittel wurden Wasser (0.1% HCOOH) und MeCN (0.1% HCOOH) verwendet, wobei das Verhältnis entsprechend der jeweilig angegebenen Gradienten linear verändert wurde.

HPLC

Die analytischen HPLC-Läufe wurden an einem *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000* System bei 28 °C durchgeführt. Das System besteht aus einer *LPG-3400SD* Pumpe, einem *WPS-3000SL* Autosampler, einem *TCC-3000SD* Säulenofen und einem *DAD-3000* Detektor. Als stationäre Phase wurde eine *ACE UltraCore 2.5 SuperC₁₈* Säule (150 x 2.1 mm, 2.5 µm, 95 Å) mit einer Flussrate von 0.42 mL/min oder eine *ACE 3 C₁₈* Säule (150 mm x 3.0 mm, 3 µm) mit einer Flussrate von 0.60 mL/min verwendet. Als Eluenten wurden Mischungen aus A = Wasser + 0.1% TFA und B = Acetonitril + 0.085% TFA verwendet.

Für semi-präparative Aufreinigungen der Peptide wurde ein *Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000* semi-präparatives System, bestehend aus einer *HPG-3200BX* Pumpe, einem *ERC Series-300* Lösungsmittelentgaser, einem *MWD-3000* Detektor und einem *AFC-3000* Fraktionskollektor, genutzt. Als stationäre Phase wurde entweder eine *Macherey-Nagel VP Nucleodur C₁₈ Gravity* Säule (125 x 21 mm, 5 µm, 110 Å) bei einer Flussrate von 15.0 mL/min, oder eine *ACE 5 SuperC₁₈* Säule (150 x 10 mm, 5 µm, 90 Å) mit einem Fluss von 7.00 mL/min verwendet. Als Eluenten wurden Mischungen aus A = Wasser + 0.1% TFA und B = Acetonitril + 0.085% TFA verwendet.

Alle angegebenen Retentionszeiten t_s entsprechen den absoluten Retentionszeiten, da kein Totzeitmarker verwendet wurde. Nach der Aufreinigung wurden die Verbindungen an einer Gefriertrocknungsanlage des Typs *Alpha 2-4 LD plus* der Firma *Christ* gefriergetrocknet.

Säulenchromatographie

Als stationäre Phase für die Säulenchromatographie wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm) der Firma *Merck* verwendet. Die Elution erfolgte bei Raumtemperatur unter Verwendung eines Pressluft- bzw. Stickstoff-Überdrucks.

6.2 Allgemeine Arbeitsvorschriften

AA1: Vorschrift für die Beladung von 2-Chlorotritylchlorid-Harzen

AA1.1: Beladung mit Standard Fmoc-Aminosäuren

Zur Beladung des Harzes wurde die Fmoc-Xaa-OH (2.0 eq) in DMF gelöst (10.0 mL/g Harz) und zu dem Harz in eine Glas-Fritte überführt. Nach der Zugabe von DIPEA (6.0 eq) wurde für 1 h ein N₂-Gegenstrom durchgeleitet (4 h bei Fmoc-Cys(Trt)-OH). Das Harz wurde danach mit DMF (6x) und DCM (4x) gewaschen. Das Harz wurde für 30 min mit einer Mischung aus DCM/MeOH/DIPEA (80:15:5) behandelt. Der Vorgang wurde wiederholt und das Harz anschließend mit DMF (6x) und DCM (4x) gewaschen. Das Harz wurde am Feinvakuum getrocknet.

AA1.2 Beladung von sterisch anspruchsvollen Fmoc-Aminosäuren

Zur Beladung des Harzes wurde die Fmoc-Xaa-OH (1.1 eq) in DMF (20.0 mL/g Harz) gelöst und zu dem Harz (1.0 eq) in ein Falcon-Tube überführt. Nach der Zugabe von DIPEA (3.0 eq) wurde die Suspension für 12-16 h bei RT im Laborschüttler durchmischt. Anschließend wurde das Harz in eine Glas-Fritte überführt und mit DCM (2x) gewaschen. Anschließend wurde für 15 min mit einer Mischung aus DCM/MeOH/DIPEA (80:15:5) behandelt. Der Vorgang wurde wiederholt und das Harz anschließend mit DCM (4x) gewaschen. Das Harz wurde am Feinvakuum getrocknet.

AA1.3: Beladung mit Thiolen

Zur Beladung des Harzes wurde das entsprechende Thiol (1.0 eq) in DCM (20.0 mL/g Harz) gelöst und zu dem Harz (1.0 eq) in ein Falcon-Tube überführt. Nach der Zugabe von DIPEA (5.0 eq) wurde die Suspension für 12-16 h bei RT im Laborschüttler durchmischt. Anschließend wurde das Harz in eine Glas-Fritte überführt und mit DCM (2x) gewaschen. Anschließend wurde für 15 min mit einer Mischung aus DCM/MeOH/DIPEA (80:15:5) behandelt. Der Vorgang wurde wiederholt und das Harz anschließend mit DCM (4x) gewaschen. Das Harz wurde am Feinvakuum getrocknet.

AA2: Bestimmung der Harzbeladung

Zur Bestimmung der Harzbeladung wurden 1.10 – 2.50 mg des beladenen Harzes abgewogen und eine Probeabspaltung vorgenommen. Zur Fmoc-Testabspaltung wurde das Harz für 30 min in 1.0 mL einer 25%igen Piperidin-Lösung in DMF behandelt. Anschließend wurde die Lösung mit 5.0 mL Methanol verdünnt und die Absorption bei einer Wellenlänge von 289 nm [$\epsilon = 5800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] und 300 nm [$\epsilon = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] gemessen. Mit Hilfe von Gleichung 1 lässt sich die Harzbeladung berechnen:

$$\text{Beladung} \left[\frac{\text{mmol}}{\text{g}} \right] = \frac{A_{289/300\text{nm}}}{\epsilon_{289/300\text{nm}} \cdot \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1} \cdot D[\text{cm}]} \cdot \frac{V_{\text{Messkolben}}[\text{mL}]}{m_{\text{Harz}}[\text{g}]} \quad (1)$$

D = Dicke der Küvette

A = gemessene Absorption

$\epsilon_{289\text{nm}} = 5800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$\epsilon_{300\text{nm}} = 7800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

AA3: Generelles Schema zur Fmoc-Abspaltung

Das Harz wurde für 30 min in DMF gequellt. Anschließend wurde das Harz mit einer 25%igen Piperidin-Lösung in DMF für 10 min behandelt. Nach einer erneuten Zugabe und weiteren 10 min Behandlung wurde mit DMF (6x), DCM (3x) und DMF (2 Min.) gewaschen.

AA4: Generelles Schema zur Peptidkupplung

Die zu kuppelnde Aminosäure Fmoc-Xaa-OH (3.0 eq im Bezug zur Harzbeladung) wurde in 2.0 mL DMF gelöst und zu dem Harz überführt. Nach der Zugabe von HBTU (3.0 eq) in 2.0 mL DMF und DIPEA (6.0 eq) wurde für 1 h ein N₂-Gegenstrom durchgeleitet. Es wurde mit DMF (6x) und DCM (3x) gewaschen. Anschließend wurden alle Schritte entsprechend der Allgemeine Arbeitsvorschrift **AA3** durchgeführt. Diese Vorgänge wurden wiederholt, bis die gewünschte Aminosäuresequenz erreicht wurde. Der letzte Waschvorgang erfolgt mit DMF (6x) und DCM (6x). Anschließend wurde das am Harz gebundene Peptid über Nacht am Feinvakuum getrocknet.

AA5: Abspalten des Harzes vom Peptid

Das am HV über Nacht getrocknete, am Harz gebundene Peptid wurde durch die Behandlung mit einer Mischung aus TFA/H₂O/TIPS (95:4:1) für 1 h (4 h bei Cys(Trt)-beladenen oder enthaltenden Harzen) vom Harz abgespalten. Anschließend wurde das Harz zwei Mal mit der Abspaltlösung gewaschen. Die Lösung wurde am Rotationsverdampfer aufkonzentriert. Das Peptid wurde anschließend in kaltem abs. Et₂O gefällt, zentrifugiert und zwei Mal mit Et₂O gewaschen. Die Rohpeptide wurde lyophilisiert und als farbloses Pulver erhalten.

AA6: Synthese am Liberty Blue Peptidsynthesizer

Die Darstellung der Peptide erfolgte über die automatisierte und mikrowellenbeschleunigte Peptidfestphasensynthese an einem Peptidsynthesizer vom Typ Liberty Blue der Firma CEM. Für die Synthese wurde ein mit der ersten Fmoc-geschützten Aminosäure vorbeladenes 2-Chlortritylchlorid-Harz verwendet. Zunächst wurde das Harz für 30 min in DMF (5.0 mL) gequellt und anschließend in das Reaktionsgefäß überführt. Die Aminosäuren werden abgewogen und pro eingesetztes Äquivalent in 2.6 mL DMF gelöst. Die Synthese selbst basiert auf der Wiederholung einer Abfolge aus Piperidin-vermittelter Fmoc-Entschützungen und DIC/Oxyma-vermittelter Kupplung:

- Fmoc-Entschätzung: T = 50 °C, Mikrowellenleistung = 30 W, t = 210 s mit Piperidin (20% (w/w) in DMF, je 3 mL pro Entschätzungsschritt)
- Aminosäurekupplung (für alle Aminosäuren außer Arg): T = 50 °C, Mikrowellenleistung = 30 W, t = 600 s mit Aminosäure (0.2 M in DMF, 5.0 eq, 2.5 mL pro Kupplungsschritt), DIC (0.5 M in DMF, 5.0 eq, 1.0 mL pro Kupplungsschritt) und Oxyma (1 M in DMF, 5.0 eq, 0.5 mL)
- Aminosäurekupplung mit Arg:
 - 1) T = 25 °C, 1500 s, ohne Mikrowelle
 - 2) T = 50 °C, Mikrowellenleistung = 35 W, t = 660 s mit Aminosäure (0.2 M in DMF, 5.0 eq, 2.5 mL pro Kupplungsschritt), DIC (0.5 M in DMF, 5.0 eq, 1.0 mL pro Kupplungsschritt) und Oxyma (1 M in DMF, 5.0 eq, 0.5 mL).

AA7: Schema für die intramolekulare Succinimid-Thioether-Ligation von Hexapeptiden

Für die intramolekulare Ligation zum Hexapeptid wurde das lineare Peptid in *n*-Butanol gelöst, sodass eine 1 mM Lösung entsteht. Es wurde vier Stunden unter Rückfluss (120 °C) erhitzt und im Anschluss das *n*-Butanol unter Vakuum abdestilliert. Der Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Das Rohprodukt wurde mittels präoperativen HPLC aufgereinigt.

AA8: Schema für die intermolekulare Succinimid-Thioether-Ligation zweier Peptide

Für die intermolekulare Ligation, bei einer Stoffmenge von 100 µmol, wurden die beiden Peptidstränge in einem 1:1 Verhältniss in 0.5 mL DMSO gelöst und für zwei Stunden reagieren gelassen. Der Reaktionsfortschritt wurde mittels analytischer HPLC verfolgt und nach Reaktionsende das Peptid mittels präoperativer HPLC aufgereinigt und lyophilisiert.

AA9: Reduktion von Fmoc-Aminosäuren

Die Fmoc-geschützte Aminosäure (5.00 mmol, 1.0 eq) wurde unter Schutzgas in 10.0 mL Dimethoxyethan gelöst und auf -13 °C gekühlt. Es wurden nacheinander *N*-Methylmorpholin (5.00 mmol, 1.0 eq) und Chlorameisensäureethylester (5.00 mmol, 1.0 eq) langsam zu getropft und für eine Stunde bei -10 °C rühren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde filtriert und das Filtrat auf -15 °C gekühlt. Es wurde eine Lösung aus Natriumborhydrid (7.50 mmol, 1.5 eq) in 2.5 mL dest. Wasser zugegeben. Nach 30 Sekunden rühren wurden weitere 125 mL dest. Wasser zugegeben. Es wurde für weitere 30 Minuten rühren gelassen. Der gebildete Niederschlag wurde filtriert und mit H₂O und Pentan gewaschen. Der Rückstand wurde am Feinvakuum getrocknet.

AA10: Appel Reaktion mit elementarem Iod

Triphenylphosphin (6.00 mmol, 3.0 eq) Iod (6.00 mmol, 3.0 eq) und Imidazol (10.0 mmol, 5.0 eq) wurden unter Schutzgas in 30 mL DCM_{abs.} gelöst. Der Alkohol (2.00 mmol, 1.0 eq) wurde in 20 mL DCM_{abs.} gelöst und langsam zu dem Reaktionsgemisch getropft. Die Reaktion wurde bis zum vollständigen Umsatz rühren gelassen (DC-Kontrolle: Cyclohexan/EtOAc; 3:1). Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt.

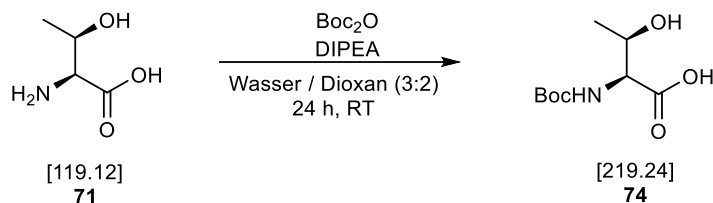
AA11: Spaltung von Thioacetaten mit Tetraethylammoniumcyanid

Das Thioacetat (0.50 mmol, 1.0 eq) wurde unter Schutzgas in einem 1:1 Gemisch aus Chloroform und Methanol gelöst. Nach der Zugabe von Tetraethylammoniumcyanid (0.25 mmol, 0.5 eq) wurde das Reaktionsgemisch für 3 h bei Raumtemperatur rühren gelassen. Die Lösung wurde mit 30 mL dest. Wasser verdünnt und drei Mal mit je 30 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde am Feinvakuum getrocknet. Das freie Thiol wurde in quantitativen Ausbeuten erhalten.

6.3 Darstellung von Aminosäurederivaten

6.3.1 Darstellung von *N*-Fmoc-*S*-trityl-*L*-allo-Thiothreonin (Fmoc-Tht(Trt)-OH)

6.3.1.1 Darstellung von *N*-Boc-*L*-Threonin (SLD263)



Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
L-Threonin	119.12	25.2	1.00	3.00	
Boc ₂ O	218.25	31.5	1.25	6.87	
DIPEA	129.25	37.8	1.50	4.73	6.23
Wasser					40.0
Dioxan					26.0

Durchführung:

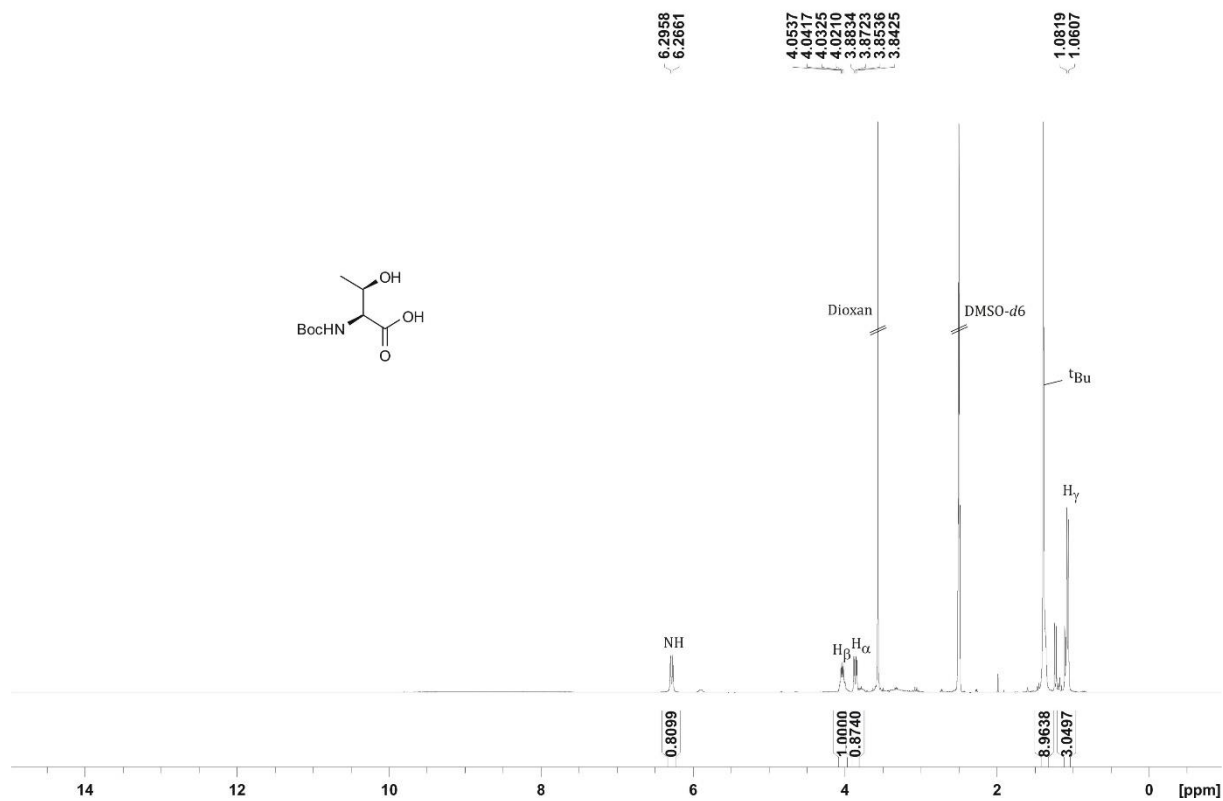
L-Threonin (3.00 g, 25.2 mmol, 1.00 eq) wurden in 40.0 mL Wasser und 13.0 mL Dioxan gelöst und mit DIPEA versetzt. Anschließend wurde eine Lösung aus Boc₂O (6.87 g, 31.5 mmol, 1.25 eq) in 13.0 mL Dioxan langsam zugetropft. Das Reaktionsgemisch wurde für 24 h bei RT rühren gelassen. Die Lösung wurde mit einer 2 N HCl-Lösung auf pH = 3.0 eingestellt und anschließend vier Mal mit je 50.0 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde am Feinvakuum getrocknet. Es wurden 4.47 g (20.4 mmol, 81%) der Titelverbindung **74** als farbloser Feststoff erhalten.

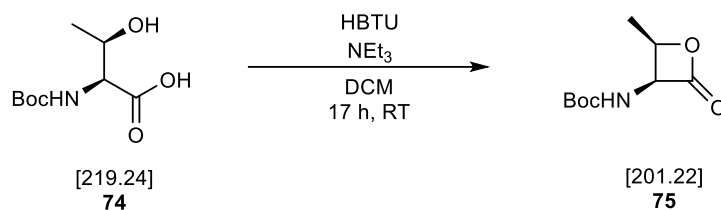
DC: $R_f = 0.28$ (EtOAc/MeOH 3:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, DMSO- d_6 ; $\delta = 6.32$ (d, 1H, $^3J = 9.0$ Hz, NH), 4.00-4.08 (m, 1H, H_β), 3.87 (dd, 1H, $^3J = 3.3$ Hz, $^3J = 9.1$ Hz, H_α), 1.39 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.07 (d, 3H, $^3J = 6.4$ Hz, H_γ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, DMSO- d_6 ; $\delta = 172.5$ (CO_2H), 155.6 (N- CO_2^-), 78.2 ($-\text{C}-(\text{CH}_3)_3$), 66.3 (C_β), 59.4 (C_α), 28.1 ($(\text{CH}_3)_3$), 20.3 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_5]^+$ (M+Na); ber.: 242.0999, gef.: 242.0999.



6.3.1.2 Darstellung von *N*-Boc-L-Threoninyl- β -lacton (SLD267)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
<i>N</i> -Boc-L-Threonin	219.12	20.0	1.00	4.40	
HBTU	379.24	32.0	1.60	12.1	
Triethylamin	101.19	80.0	4.00	8.10	11.2
DCM					220

Durchführung:

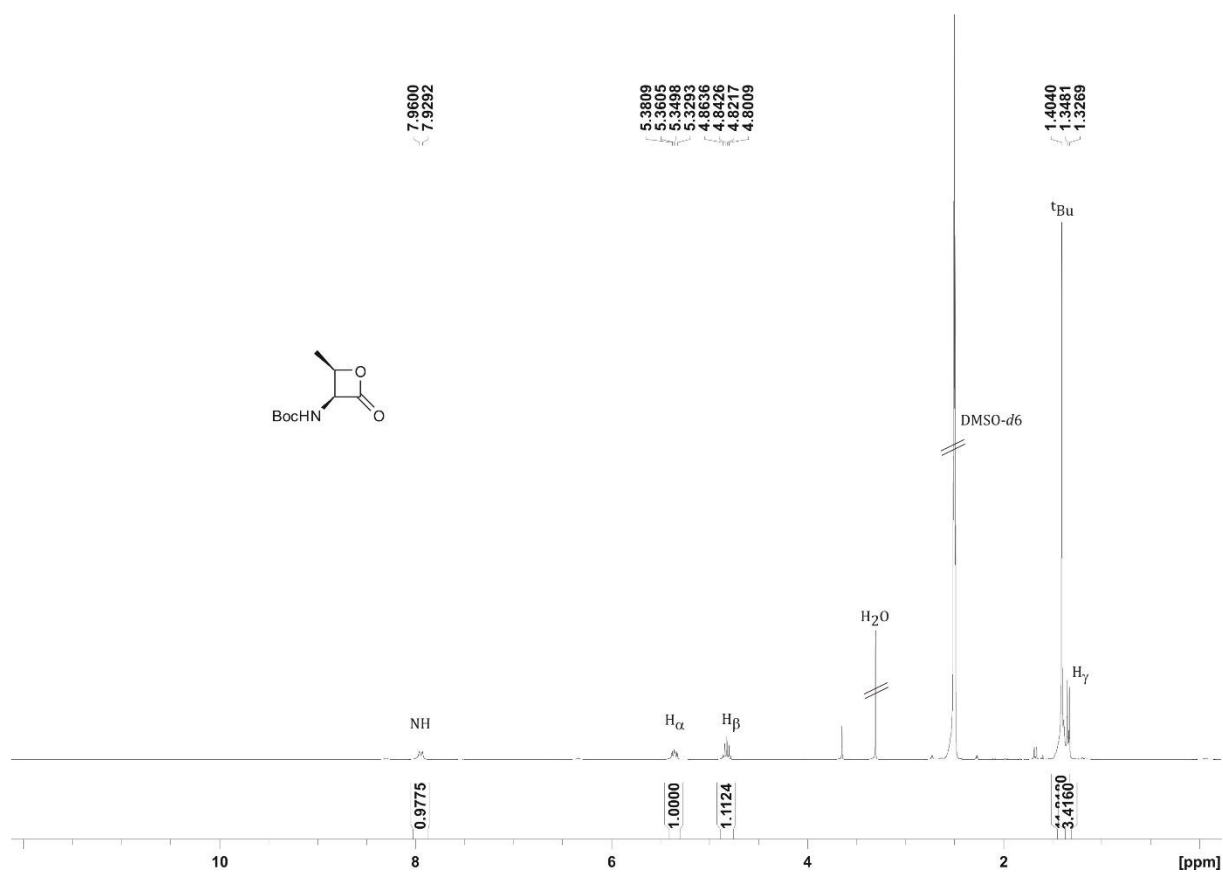
N-Boc-L-Threonin (4.40 g, 20.0 mmol, 1.00 eq) wurde in DCM gelöst und nacheinander mit HBTU (12.1 g, 32.0 mmol, 1.60 eq) und Triethylamin (11.2 mL, 80.0 mmol, 1.60 eq) versetzt. Die Suspension wurde für 17 h bei RT rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch (Pentan/EtOAc; 4:1) an Kieselgel aufgereinigt. Es wurden 2.41 g (12.0 mmol, 60%) der Titelverbindung **75** als farbloser Feststoff erhalten.

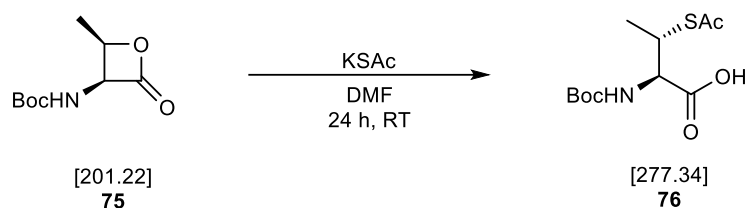
DC: $R_f = 0.77$ (*n*-Pentan/EtOAc 1:1).

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.96$ (d, 1H, $^3J = 9.4$ Hz, NH), 5.36 (dd, 1H, $^3J = 6.1$ Hz, $^3J = 9.4$ Hz, H_α), 4.82 (qi, 1H, $^3J = 6.3$ Hz, H_β), 1.40 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.34 (d, 3H, $^3J = 6.2$ Hz, H_γ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 170.1$ (CO_2H), 154.8 (N- CO_2^-), 79.2 ($-\text{C}-(\text{CH}_3)_3$), 74.6 (C_β), 59.6 (C_α), 28.0 ($(\text{CH}_3)_3$), 14.5 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_9\text{H}_{15}\text{NO}_4]^+$ (M+Na); ber.:224.0893, gef.:224.0900.



6.3.1.3 Darstellung von *N*-Boc-*S*-acetyl-L-*allo*-Thiothreonin (SLD268)

Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
<i>N</i> -Boc-L-Threoninyl- β -lacton	201.22	6.07	1.00	1.22	
Kaliumthioacetat	114.21	7.89	1.30	0.90	
DMF					90.0

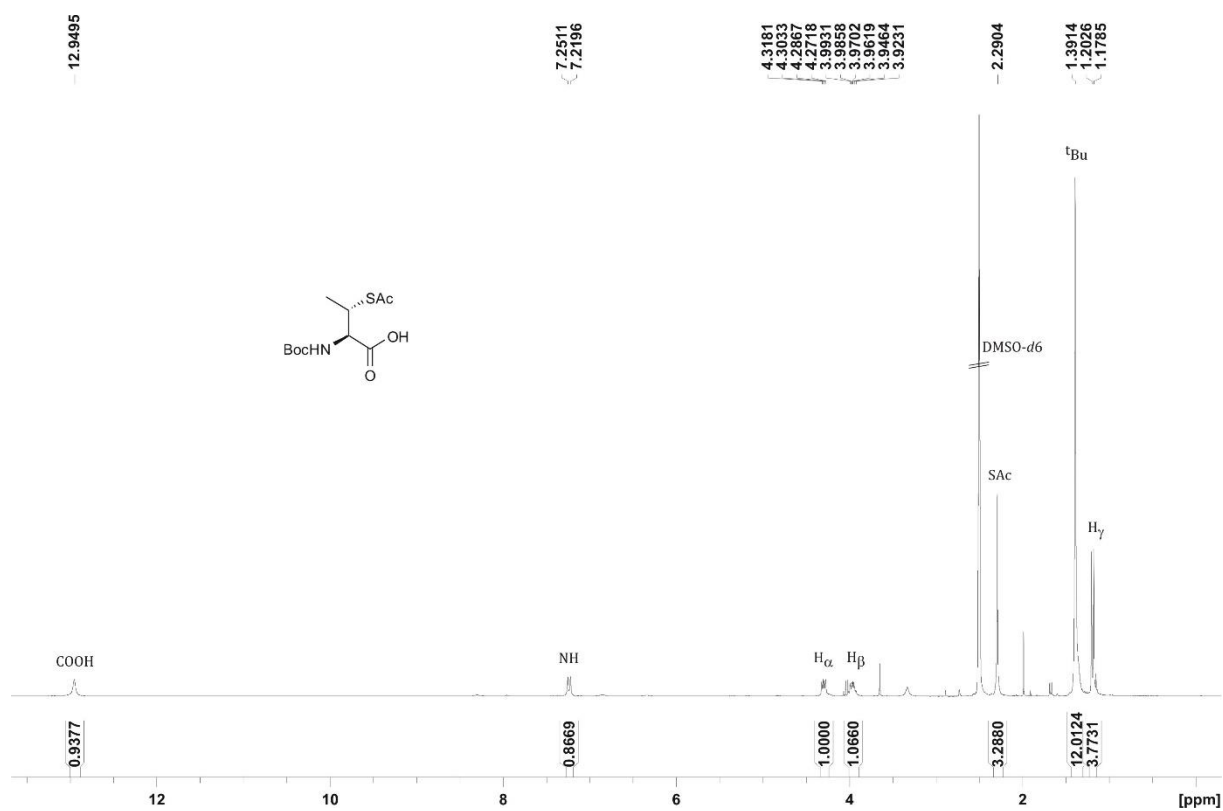
Durchführung:

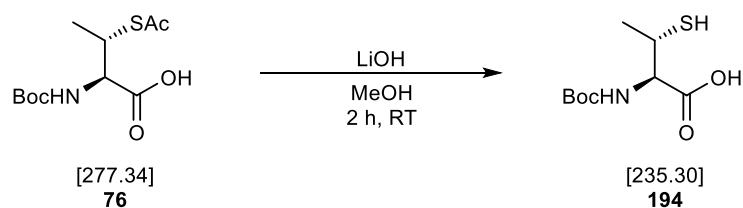
Das *N*-Boc-L-Threoninyl- β -lacton (1.22 g, 6.07 mmol, 1.00 eq) wurde unter Argon-Atmosphäre in 90.0 mL DMF gelöst und mit Kaliumthioacetat (0.90 g, 7.89 mmol, 1.30 eq) versetzt. Die Lösung wurde für 24 h bei RT rühren gelassen. Es wurden 200 mL Essigsäureethylester zu dem Reaktionsgemisch gegeben und drei Mal mit je 100 mL 1 N HCl-Lösung und zwei Mal mit 5%iger LiCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde am Feinvakuum getrocknet. Es wurden 1.41 g (5.08 mmol, 84%) des Produktes **76** als gelber Feststoff erhalten.

DC: $R_f = 0.43$ (*n*-Pentan/Essigester 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 12.98$ (s, 1H, CO_2H), 7.27 (d, 1H, $^3J = 9.5$ Hz, NH), 4.29 (dd, 1H, $^3J = 4.5$ Hz, $^3J = 9.5$ Hz, H_α), 3.92-4.01 (m, 1H, H_β), 1.39 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.19 (d, 3H, $^3J = 7.3$ Hz, H_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{S}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 300.0876, gef.: 300.0874.



6.3.1.4 Darstellung von *N*-Boc-L-*allo*-Thiothreonin (SLD271)**Ansatz:**

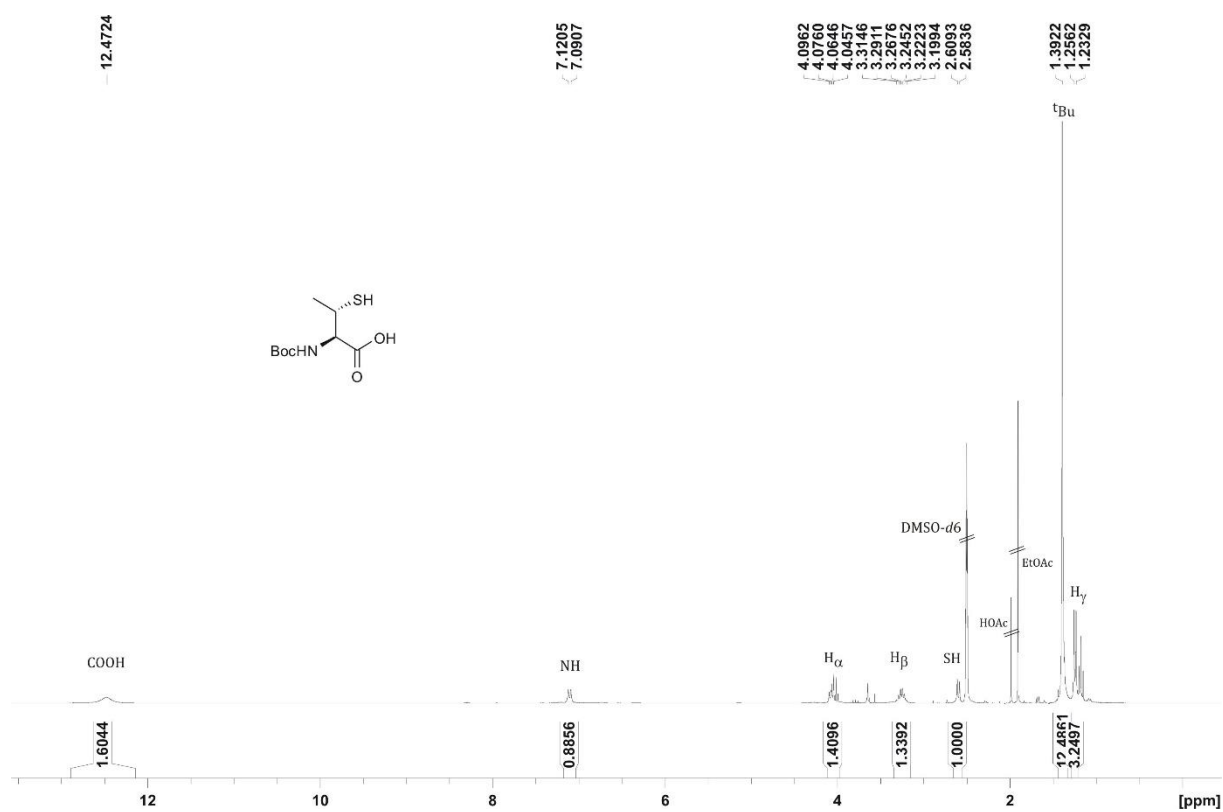
Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
<i>N</i> -Boc- <i>S</i> -acetyl-L- <i>allo</i> -Threonin	277.34	5.06	1.00	1.40	
Lithiumhydroxid (1 M)	23.89	10.1	2.00		12.0
Methanol					100

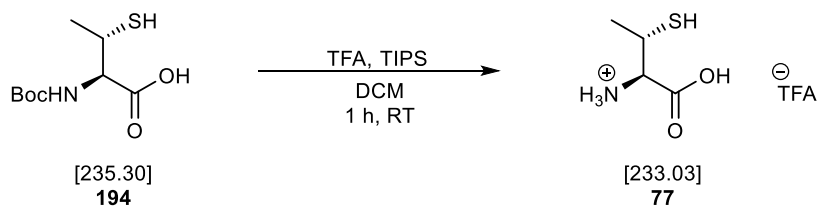
Durchführung:

N-Boc-*S*-acetyl-L-*allo*-Threonin (1.40 g, 5.06 mmol, 1.00 eq) wurde in 100 mL Methanol gelöst und bei RT mit 12 mL einer 1 M LiOH-Lösung versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 2 h bei RT rühren gelassen. Es wurden 20.0 mL dest. Wasser hinzugegeben und mit einer 1 N HCl-Lösung pH = 1 eingestellt. Die wässrige Phase wurde zwei Mal mit je 200 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde am Feinvakuum getrocknet. Es wurden 1.19 g (5.05 mmol, 99%) der Titelverbindung **194** als gelbes Öl erhalten.

DC: $R_f = 0.33$ (DCM/MeOH 5:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 12.58$ (s, 1H, CO_2H), 7.14 (d, 1H, $^3J = 8.9$ Hz, NH), 4.07 (dd, 1H, $^3J = 5.9$ Hz, $^3J = 8.9$ Hz, H_α), 3.22-3.29 (m, 1H, H_β), 2.60 (d, 1H, $^3J = 7.9$ Hz, SH), 1.39 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.24 (d, 3H, $^3J = 7.0$ Hz, H_γ) ppm.



6.3.1.5 Darstellung von L-*allo*-Thiothreonin als Trifluoracetat-Salz (SLD273/TvK021)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
<i>N</i> -Boc -L- <i>allo</i> -Thiothreonin	235.30	5.05	1.00	1.18	
Triisopropylsilan	158.36	8.17	1.60	1.29	1.00
TFA					30.0
DCM					60.0

Durchführung:

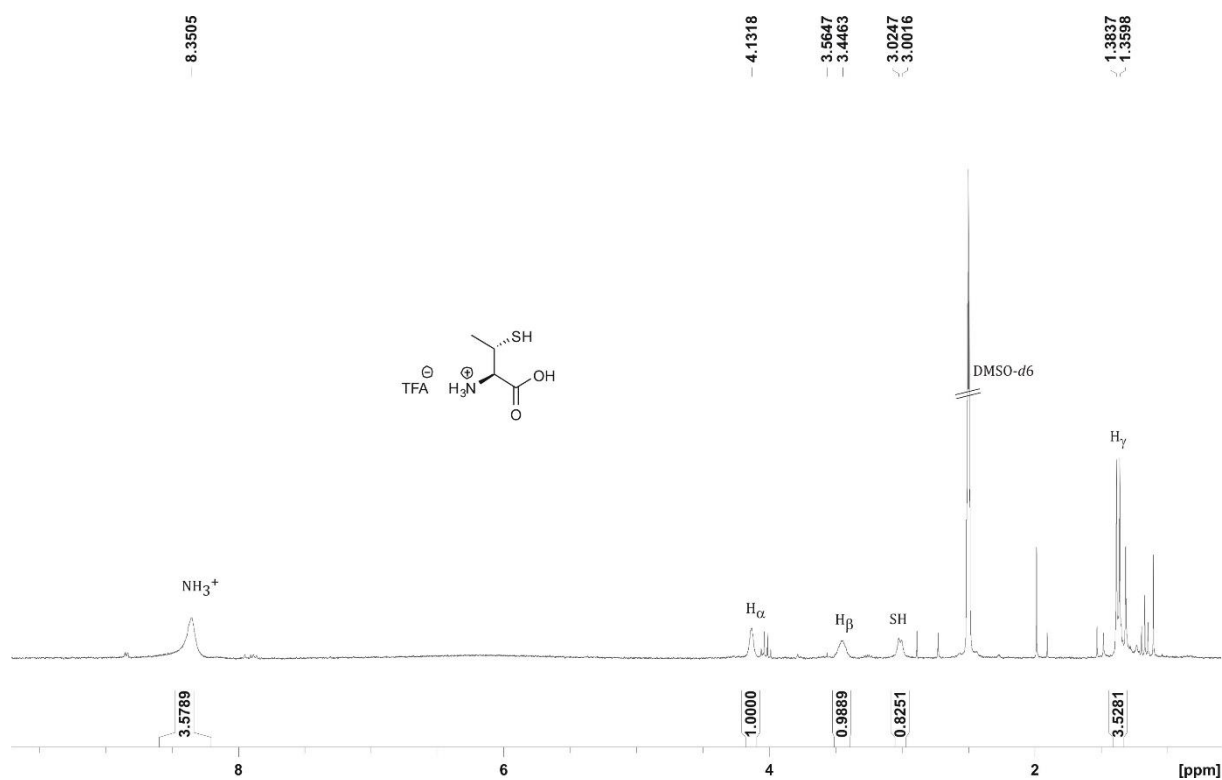
N-Boc-L-*allo*-Thiothreonin (1.18 g, 5.05 mmol, 1.00 eq) wurde in 30.0 mL DCM gelöst und mit Triisopropylsilan (1.00 mL, 8.17 mmol, 1.60 eq) versetzt. Bei 0 °C wurde ein Gemisch aus Dichlormethan (30.0 mL) und Trifluoressigsäure (30.0 mL) zugetropft. Nach Beendigung der Zugabe wurde das Reaktionsgemisch für 1 h bei RT rühren gelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Durch entfernt. Der Rückstand wurde am Feinvakuum getrocknet. Es wurden 1.17 g (5.04 mmol, 99%) des L-*allo*-Thiothreonins (**77**) als blassgelber Feststoff erhalten.

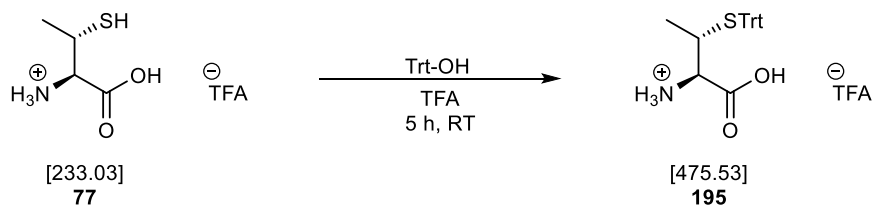
DC: $R_f = 0.18$ (DCM/MeOH 1:2)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 8.35$ (bs, 3H, NH_3), 4.13 (bs, 1H, H_α), 3.45 (m, 1H, H_β), 3.01 (d, 1H, $^3J = 6.9$ Hz, SH), 1.37 (d, 3H, $^3J = 7.1$ Hz, H_γ), ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 169.1$ (CO_2H), 44.8 (C_β), 30.1 (C_α), 15.1 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_4\text{H}_9\text{NO}_2\text{SH}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 136.0427, gef.: 136.0427.



6.3.1.6 Darstellung von *S*-Trityl-L-*allo*-Thiothreonin (SLD274/TvK28)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
L- <i>allo</i> -Thiothreonin	233.03	8.63	1.00	2.15	
Tritylmethanol	260.33	8.63	1.00	2.24	
TFA					40

Durchführung:

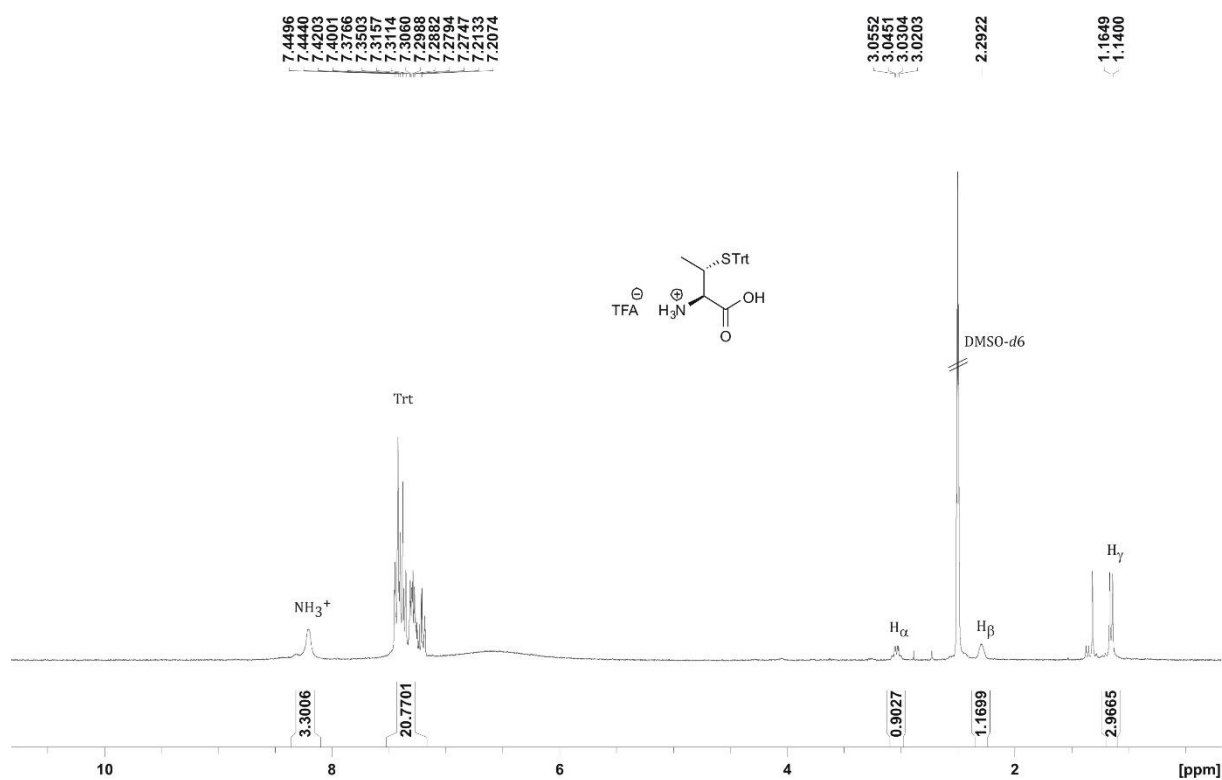
L-*allo*-Thiothreonin (2.15 g, 8.63 mmol, 1.00 eq) wurde in 40.0 mL Trifluoressigsäure gelöst und mit Tritylmethanol (2.24 g, 8.63 mmol, 1.00 eq) versetzt. Die entstandene dunkelgelbe Lösung wurde für 5 h bei RT rühren gelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Der erhaltene rote Feststoff wurde ohne weitere Aufarbeitung weiter umgesetzt.

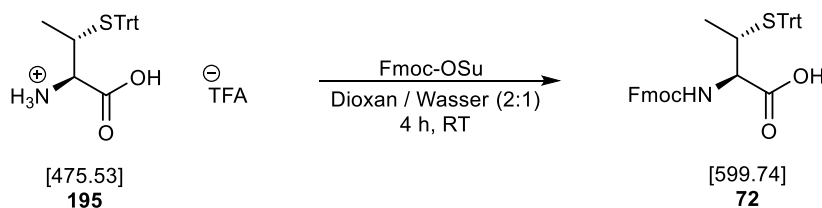
DC: $R_f = 0.55$ (DCM/MeOH 4:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.18\text{--}7.46$ (m, 15H, H_{Trt}), 3.04 (dq, 1H, $^3J = 3.0$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, H_α), 2.30 (bs, 1H, $^3J = 7.1$ Hz, H_β), 1.15 (d, 3H, $^3J = 7.5$ Hz, H_γ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 168.5$ (CO_2H), 143.7 (C_{ipso}), 128.9 ($C_{\text{ortho/meta}}$), 128.4 ($C_{\text{ortho/meta}}$), 127.1 (C_{para}), 67.8 (C_β), 55.9 (C_α), 15.9 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{NO}_2\text{SH}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 378.1522, gef.: 378.1525.



6.3.1.7 Darstellung von *N*-Fmoc-*S*-trityl-*L*-*allo*-Thiothreonin (TvK37)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
<i>S</i> -Trityl- <i>L</i> - <i>allo</i> -Thiothreonin	475.53	8.62	1.00	4.10	
Fmoc-OSu	337.33	12.9	1.50	4.35	
NaHCO ₃ (halbgesättigt)					25.0
Dioxan					40.0

Durchführung:

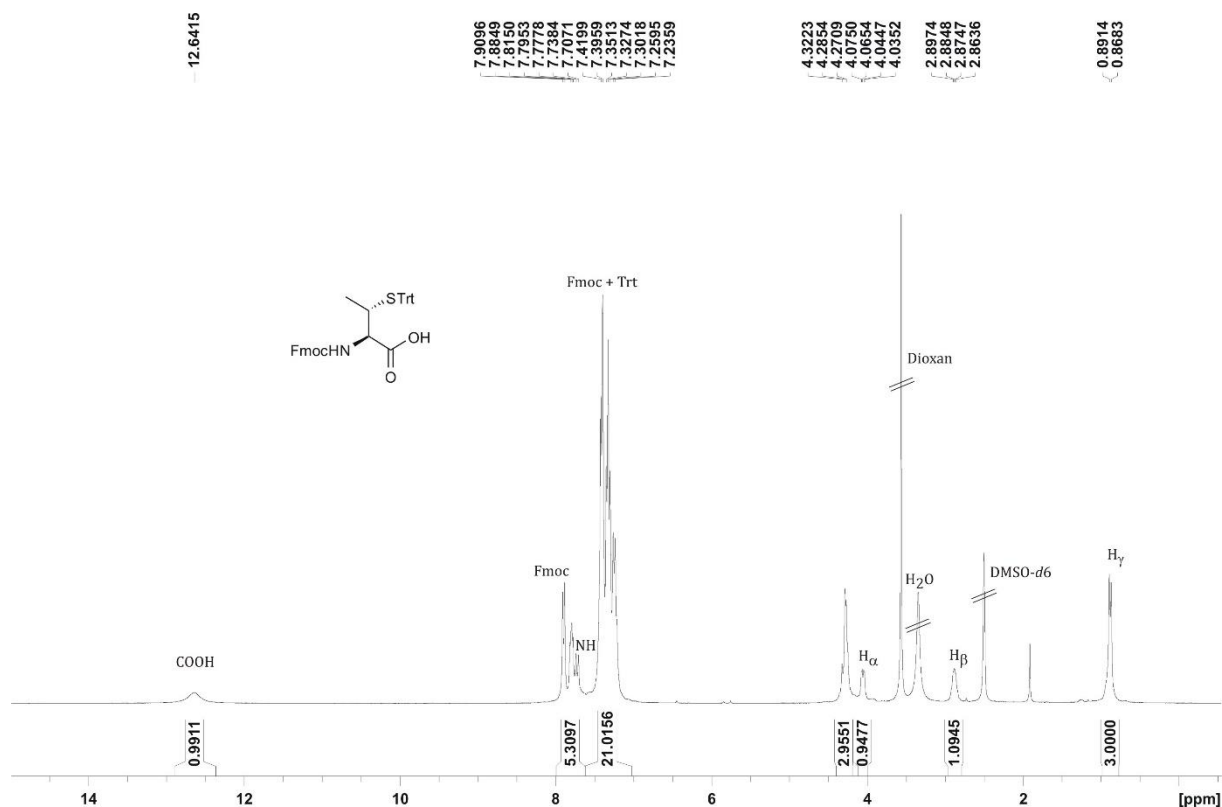
S-Trityl-*L*-*allo*-Thiothreonin (4.10 g, 8.63 mmol, 1.00 eq) wurde in 25.0 mL einer halbgesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung gelöst und mit einer Lösung aus Fmoc-OSu (4.37 g, 13.0 mmol, 1.50 eq) in 50.0 mL Dioxan versetzt. Der pH-Wert der braunen Suspension wurde durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat auf 7-8 eingestellt. Das Gemisch wurde für 4 h bei RT rühren gelassen. Anschließend wurden 150 mL einer halbgesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung zugegeben und das Reaktionsgemisch drei Mal mit je 200 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch (DCM/Methanol/Essigsäure 80:1:1) an Kieselgel aufgereinigt. Es wurden 2.49 g (4.15 mmol, 48%) des *N*-Fmoc-*S*-trityl-*L*-*allo*-Thiothreonins (**72**) als farbloser Feststoff erhalten.

DC: $R_f = 0.28$ (DCM/MeOH/Essigsäure 40:1:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 12.27$ (bs, 1H, CO_2H), 7.71-7.91 (m, 5H, NH, H_{arom} , Fmoc), 7.21-7.44 (m, 19H, H_{arom} , Fmoc, H_{arom} , Trt), 4.23-4.35 (m, 3H, CH-Fmoc, CH_2 -Fmoc), 4.04 (dd, 1H, $^3J = 3.6$ Hz, $^3J = 9.5$ Hz, H_α), 2.87 (dq, 1H, $^3J = 3.7$ Hz, $^3J = 7.3$ Hz, H_β), 0.85 (d, 3H, $^3J = 7.2$ Hz, H_γ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 171$ (CO_2H), 156.6 (N-CO_2^-), 144 (C_{ipso} , Trt), 143.8 (C_{arom} , Fmoc), 143.7 (C_{arom} , Fmoc), 140.6 (C_{arom} , Fmoc), 129.1 (C_{arom}), 128.0 (C_{arom}), 127.6 (C_{arom}), 127.6 (C_{arom}), 127.0 (C_{arom}), 126.7 (C_{arom}), 125.4 (C_{arom}), 120.0 (C_{arom}), 66.4 (Fmoc- CH_2), 58.5 (C_α), 46.6 (Fmoc-CH), 41.4 (C_β), 17.0 (C_γ) ppm.

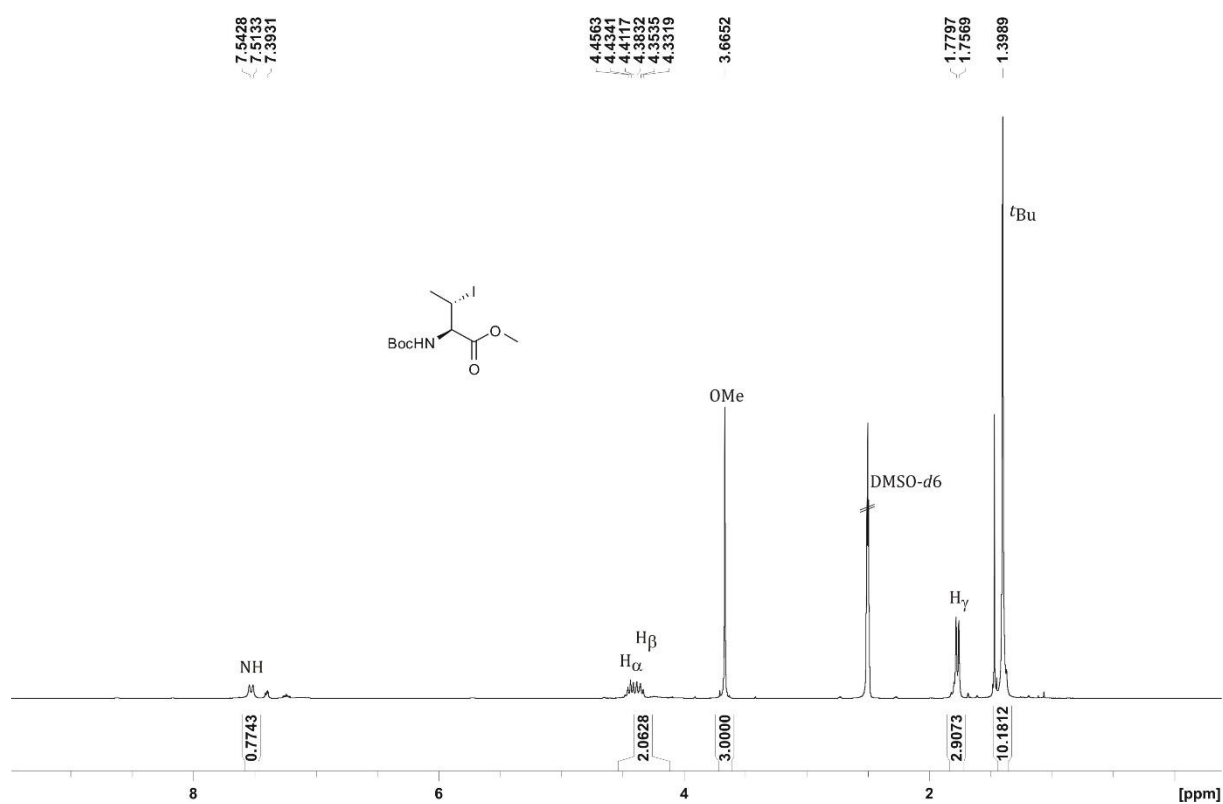
HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{38}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{S}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 622.2023, gef.: 622.2000.

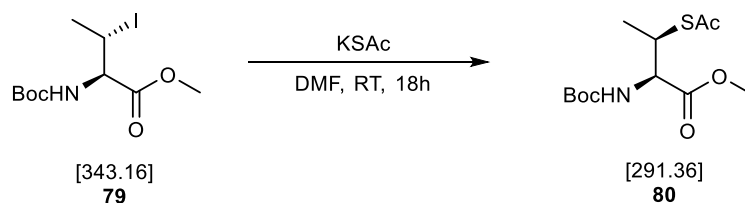


DC: $R_f = 0.54$ (Cyclohexan/EtOAc 3:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.53$ (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, NH), 4.50-4.30 (m, 2H, H_α , H_β), 3.66 (s, 3H, OMe), 1.76 (d, 3H, $^3J = 6.8$ Hz, H_γ), 1.39 (s, 9H, $t\text{Bu}$) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{NiO}_4]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 366.0173, gef.: 366.0173.



6.3.2.2 Darstellung von *N*-Boc-*S*-acetyl-L-Thiothreonin (SLD415)

Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
<i>N</i> -Boc-L-Iodthreoninmethylester	343.16	6.70	1.00	2.30	
Kaliumthioacetat	114.21	13.4	2.00	1.53	
DMF					80

Durchführung:

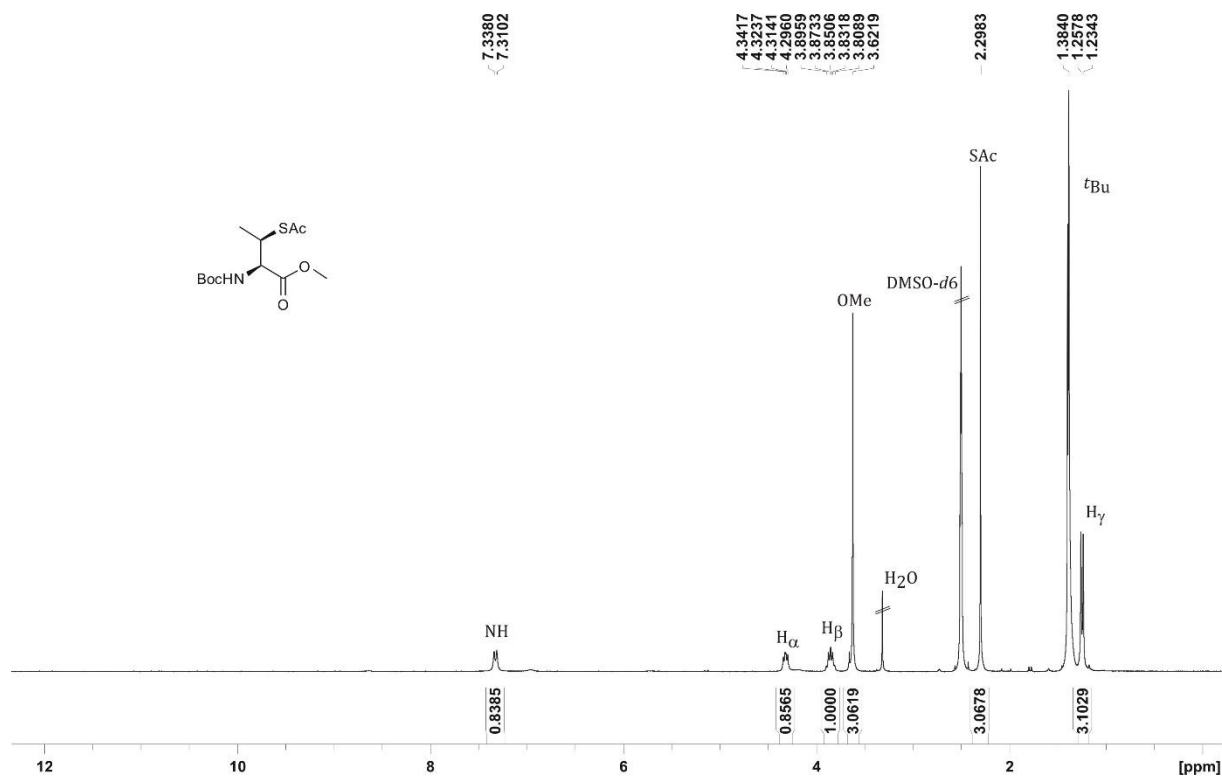
Das Iodid **79** (2.30 g, 6.70 mmol, 1.00 eq) wurde in 80 mL DMF gelöst und mit Kaliumthioacetat (1.53 g, 13.4 mmol, 2.00 eq) versetzt. Es wurde bei RT über Nacht rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde bei 40 °C abkondensiert und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/EtOAc; 3:1) aufgereinigt. Die Titelverbindung **80** (1.25 g, 4.29 mmol, 83%) wurde als braunes Öl erhalten. Es konnten 500 mg des Eduktes **79** reisoliert werden.

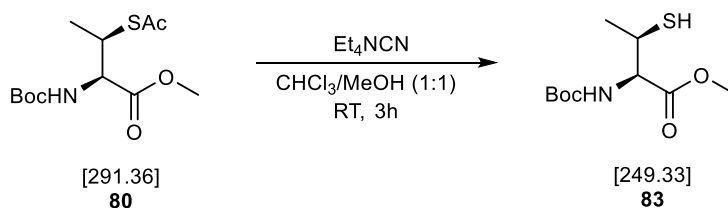
DC: $R_f = 0.41$ (Cyclohexan/EtOAc 3:1)

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.35$ (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, NH), 4.32 (dd, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, H_α), 3.85 (dq, 1H, $^3J = 7.0$ Hz, $^3J = 5.4$ Hz, H_β), 3.62 (s, 3H, OCH_3), 2.29 (s, 3H, SAc), 1.38 (s, 9H, $t\text{Bu}$), 1.24 (d, 3H, $^3J = 7.0$ Hz, H_γ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 56.9$ (C_α), 51.8 ($-\text{OCH}_3$), 40.0 (C_β), 30.3 ($-\text{SCOCH}_3$), 27.9 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 18.1 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_5]^+$ ($\text{M}+\text{H}$); ber.: 292.1213, gef.: 292.1214.



6.3.2.3 Darstellung von *N*-Boc-L-Thiothreonin (SLD417-1/SLD437)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
<i>N</i> -Boc- <i>S</i> -acetyl-L-Thiothreonin	291.36	6.86	1.00	2.00	
Tetraethylammoniumcyanid	156.27	6.86	1.00	1.07	
Chloroform					50.0
Methanol					50.0

Durchführung:

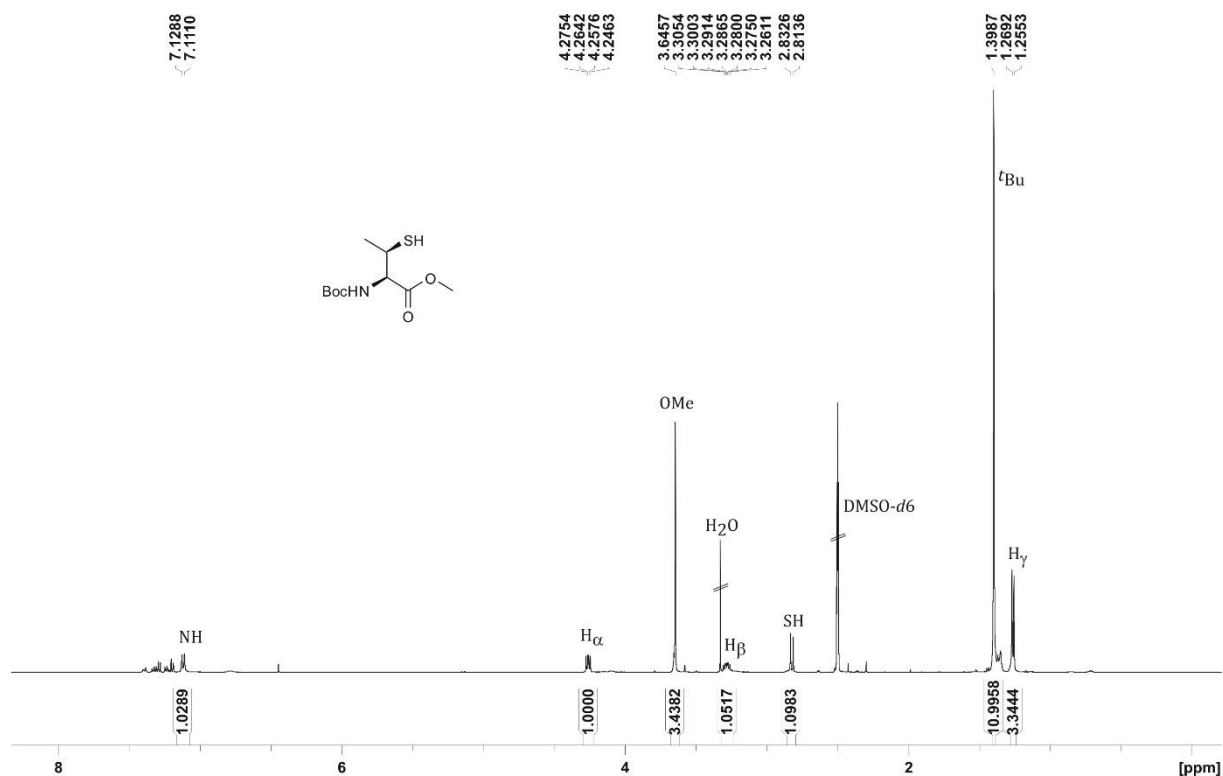
Die Reaktion wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA11** durchgeführt. Es wurden jedoch anstatt 0.5 eq 1.0 eq des Tetraethylammoniumcyanids eingesetzt. Die Titelverbindung **83** wurde als braunes Öl (1.70 g, 6.82 mmol, 99%) erhalten.

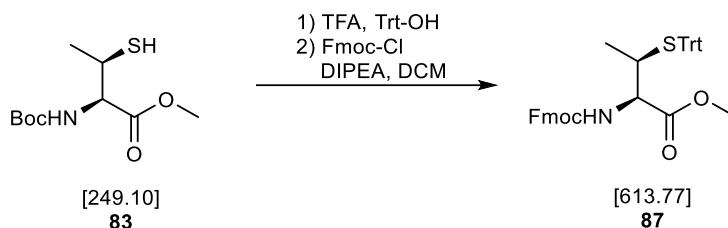
DC: $R_f = 0.56$ (Cyclohexan/EtOAc 3:1)

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.12$ (d, 1H, $^3J = 8.9$ Hz, NH), 4.26 (dd, 1H, $^3J = 8.9$ Hz, $^3J = 5.6$ Hz, H_α), 3.28 (ddd, 1H, $^3J = 9.5$ Hz, $^3J = 8.9$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, H_β), 3.64 (s, 3H, OMe), 2.82 (d, 1H, $^3J = 9.5$ Hz, SH), 1.39 (s, 9H, $t\text{Bu}$), 1.26 (d, 3H, $^3J = 6.9$ Hz, H_γ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 60.0$ (C_α), 51.6 ($-\text{OCH}_3$), 35.9 (C_β), 28.0 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22.2 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{10}\text{H}_{19}\text{NO}_5\text{S}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 272.0927, gef.: 272.0929.



6.3.2.4 Darstellung von *N*-Fmoc-*S*-trityl-*L*-Thiothreoninmethylester (SLD439-3)

Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
<i>N</i> -Boc- <i>L</i> -Thiothreoninmethylester	249.10	3.21	1.00	0.80	
Triphenylmethanol	260.34	3.21	1.00	0.84	
TFA					20.0
Fmoc-Cl	258.70	4.81	1.50	1.24	
DIPEA	129.25	9.63	3.00	1.24	1.64
DCM					30.0

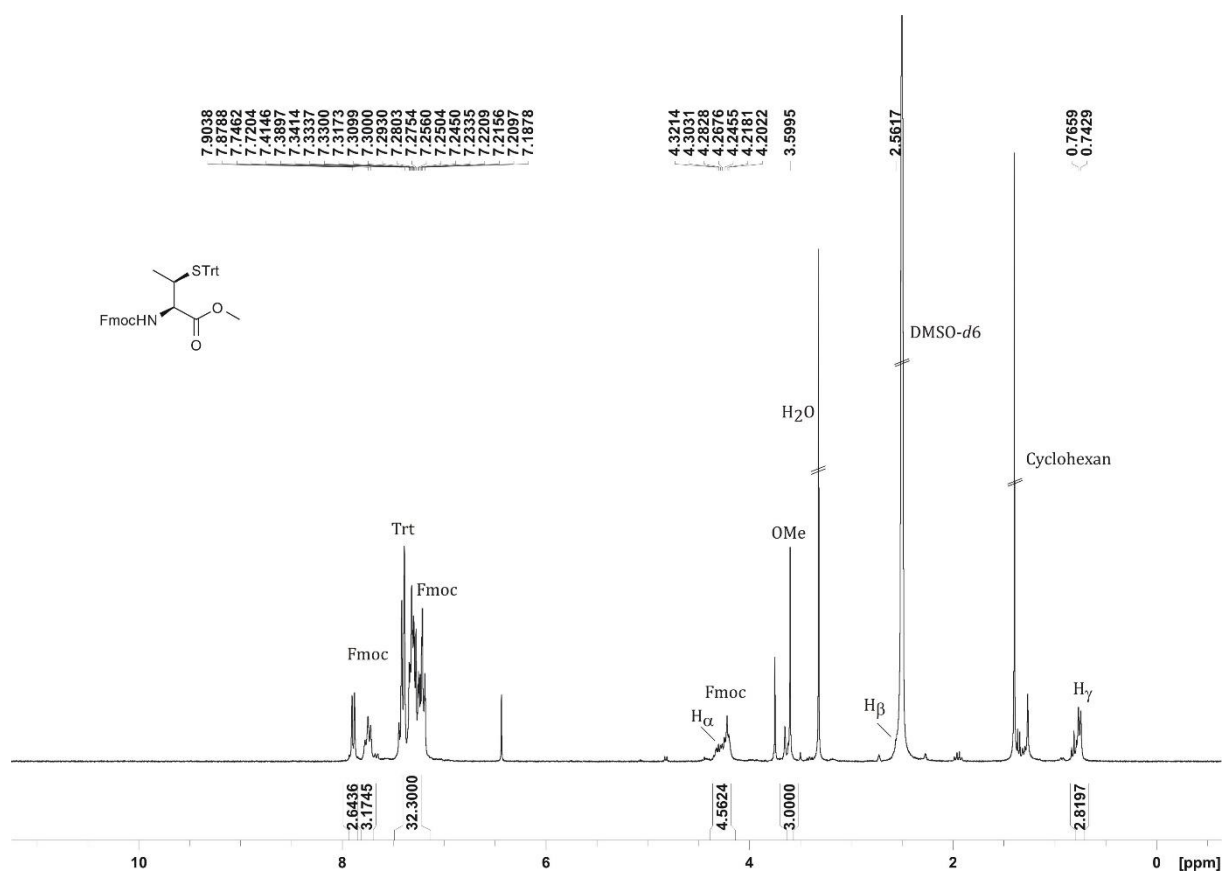
Durchführung:

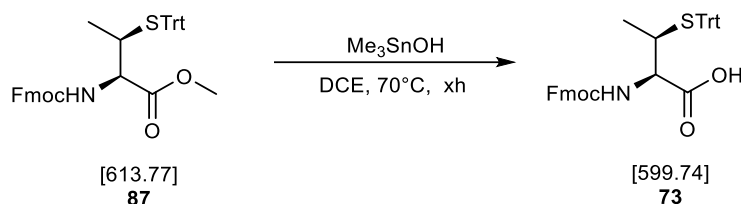
N-Boc-*L*-Thiothreoninmethylester (800 mg, 3.21 mmol, 1.00 eq) wurde in 20.0 mL TFA gelöst und für 30 min bei RT rühren gelassen. Anschließend wurde Triphenylmethanol (840 mg, 3.21 mmol, 1.00 eq) hinzugegeben und für weitere 5 h bei RT rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde dann zusammen mit Fmoc-Cl (1.24 g, 4.81 mmol, 1.50 eq) unter Schutzgas in DCM gelöst und auf 0 °C gekühlt. Es wurde DIPEA (1.64 mL, 9.63 mmol, 3.00 eq) hinzugegeben und nach erwärmen auf RT über Nacht rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/EtOAc, 3:1) aufgereinigt. Das Produkt **87** wurde als farbloser Feststoff (1.15 g, 1.87 mmol, 58%) erhalten.

DC: $R_f = 0.50$ (Cyclohexan/EtOAc 3:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.89$ (d, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, H_{arom} , Fmoc), 7.73 (d, 2H, $^3J = 7.8$ Hz, H_{arom} , Fmoc), 7.45-7.36 (m, 10H, H_{arom} , Trt), 7.36-7.15 (m, 9H, H_{arom} , Fmoc, Trt), 4.32-4.20 (m, 4H, CH-Fmoc , $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$, H_α), 3.59 (s, 3H, OMe), 2.56 (m, 1H, H_β), 0.75 (d, 3H, $^3J = 6.9$ Hz, H_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{39}\text{H}_{35}\text{NO}_4\text{S}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 636.2179, gef.: 636.2184.



6.3.2.5 Darstellung von *N*-Fmoc-*S*-trityl-*L*-Thiothreonin (SLD443/SLD456)

Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
<i>N</i> -Fmoc- <i>L</i> -Thiotrityl-threoninmethylester	613.77	0.83	1.00	510	
Trimethylzinnhydroxid	180.82	4.15	5.00	750	
DCE					25.0

Durchführung:

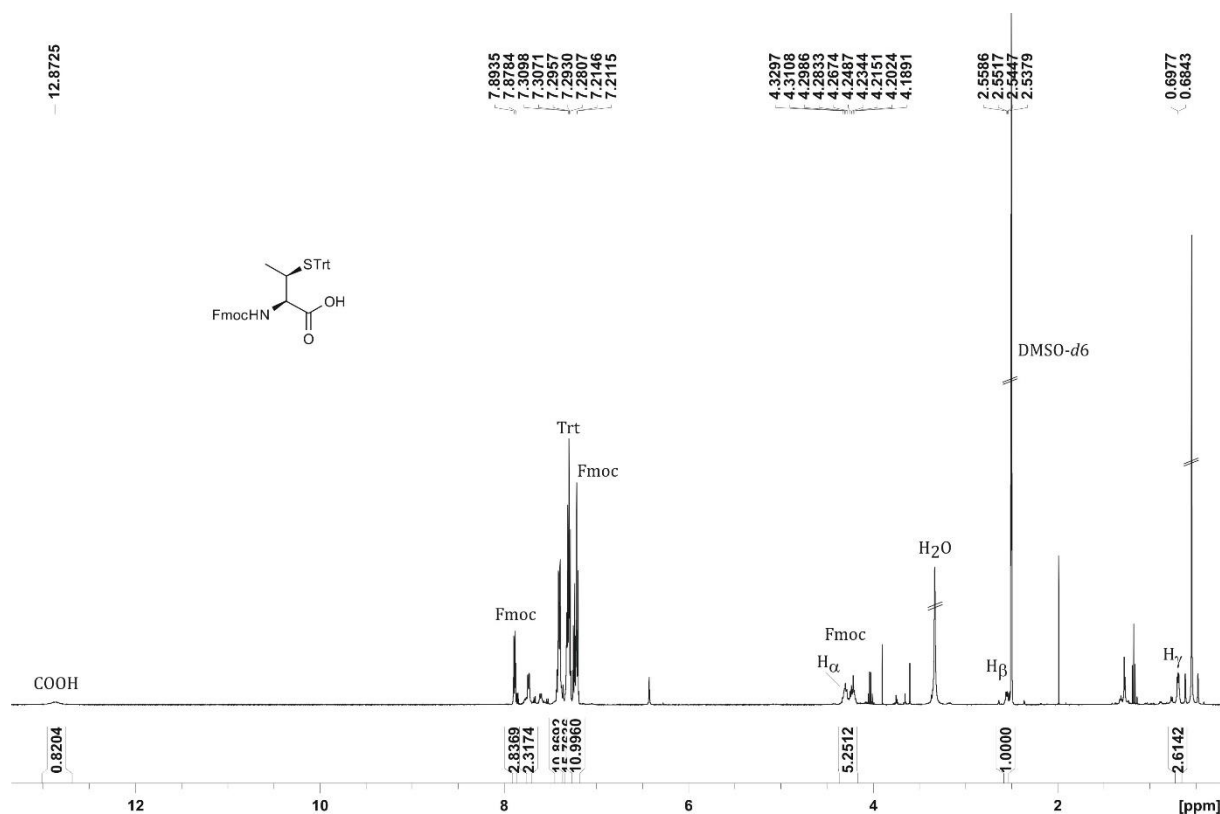
Die vollständig geschützte Aminosäure Fmoc-ThT(STrt)-OMe (500 mg, 0.48 mmol, 1.00 eq) wurde in 25 mL Dichlorethan gelöst und nach der Zugabe von Me_3SnOH (750 mg, 4.15 mmol, 5.00 eq) auf 80°C erhitzt. Es wurde für 8 h bei 80°C und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 80 mL EtOAc verdünnt und drei Mal mit je 40 mL einer 0.2 N HCl-Lsg. gewaschen. Es wurde anschließend mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Das Produkt **73** (500 mg, 0.83 mmol, quant.) wurde als farbloser Feststoff erhalten. Das Stannan (triplett bei 0.54 ppm) konnte durch die Extraktion nicht vollständig entfernt werden.

DC: $R_f = 0.10$ (Cyclohexan/EtOAc 3:1)

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 12.87$ (bs, 1H, CO_2H), 7.88 (d, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, H_{arom} , Fmoc), 7.73 (d, 2H, $^3J = 7.3$ Hz, H_{arom} , Fmoc), 7.60 (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz, NH-Fmoc), 7.44-7.36 (m, 10H, H_{arom} , Trt), 7.35-7.18 (m, 9H, H_{arom} , Fmoc, Trt), 4.37-4.17 (m, 3H, CH-Fmoc , $\text{CH}_2\text{-Fmoc}$), 4.21 (m, 1H, H_α), 2.55 (dq, 1H, $^3J = 6.7$ Hz, $^3J = 3.5$ Hz, H_β), 0.69 (d, 3H, $^3J = 6.7$ Hz, H_γ) ppm.

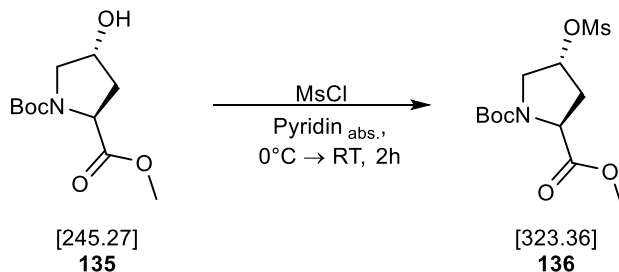
$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 128.9$ (C_{arom} , Trt), 127.8 (C_{arom}), 127.7 (C_{arom}), 127.0 (C_{arom}), 126.5 (C_{arom}), 125.2 (C_{arom} , Fmoc), 119.9 (C_{arom} , Fmoc), 65.6 (Fmoc- CH_2), 58.9 (C_α), 48.5 (Fmoc-CH), 41.5 (C_β), 17.5 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{38}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{S}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 622.2023, gef.: 622.2026.



6.3.3 Darstellung von *N*-Fmoc-(4*S*)-thiotrityl-L-Prolin (Fmoc-ThP(Trt)-OH)

6.3.3.1 Darstellung von *N*-Boc-(4*R*)-hydroxymesityl-L-Prolinmethylester (ASSL25)



Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Boc-Hyp-OMe	245.27	15.2	1.00	3.73	
MsCl	114.56	21.3	1.40	2.44	1.65
Pyridin _(abs.)	79.10				22.5

Durchführung:

Unter Argonatmosphäre wurde Boc-Hyp-OMe (3.73 g, 15.2 mmol, 1.00 eq.) in Pyridin_(abs.) gelöst. Die Lösung wurde anschließend auf 0 °C gekühlt und langsam mit MsCl (1.65 mL, 21.3 mmol, 1.40 eq.) versetzt. Die Lösung wurde für weitere 10 min bei 0 °C gerührt und danach langsam auf RT erwärmt und für weitere zwei Stunden gerührt. Nach vollständigem Umsatz wurde das Gemisch mit 10 mL MeOH verdünnt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand in 15 mL Wasser und 40 mL EtOAc aufgenommen. Die organische Phase abgetrennt, die wässrige Phase wurde danach drei Mal mit je 100 mL EtOAc ausgeschüttelt. Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Das Produkt **136** (3.27 g, 10.1 mmol, 66%) wurde als gelbe viskose Flüssigkeit erhalten.

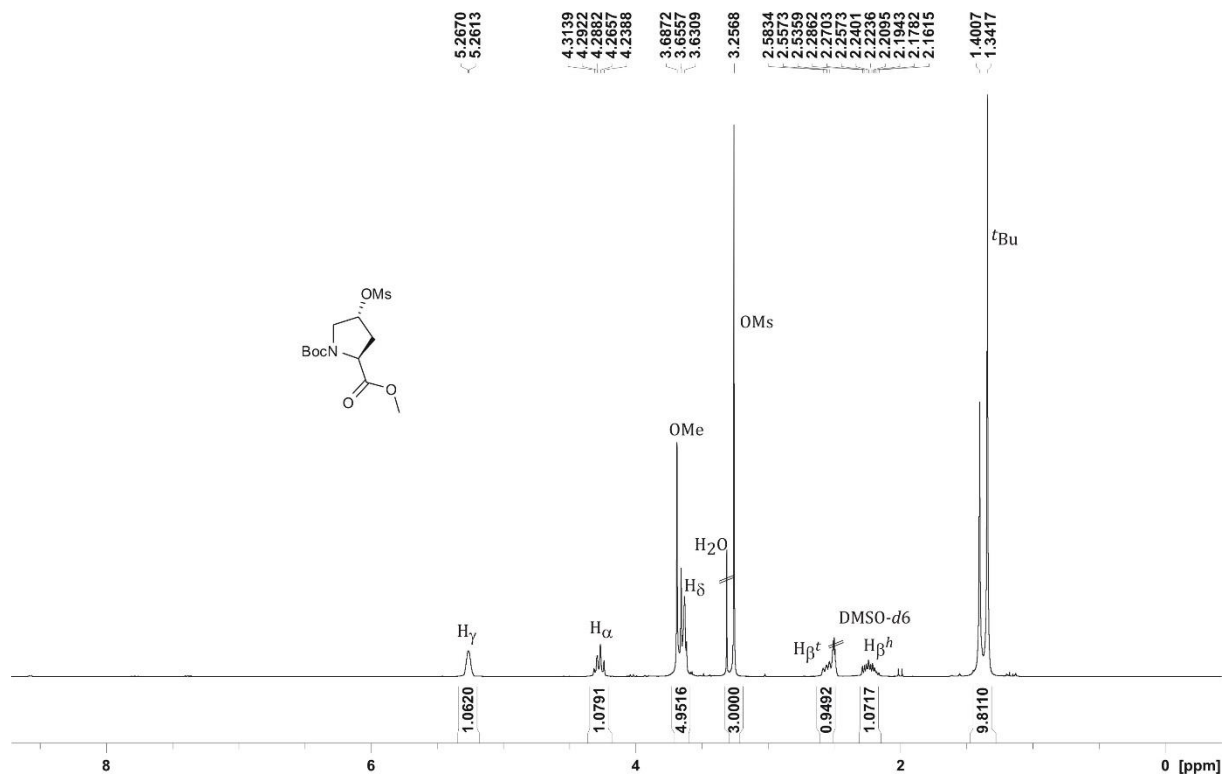
DC: $R_f = 0.31$ (Cyclohexan/Essigester 1:1)

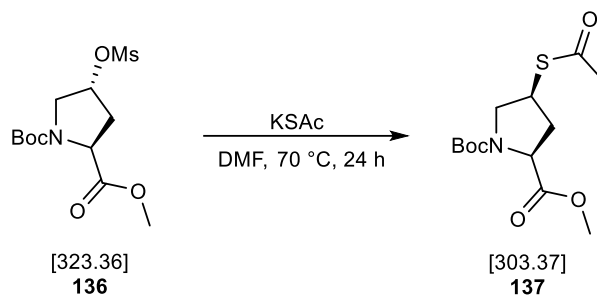
Auf Grund der *cis/trans*-Isomerie der Carbamat-Schutzgruppe ergeben sich für manche Protonen doppelte Signalsätze. Die chemischen Verschiebungen des Konformers im Unterschuss wird im Folgenden mit * gekennzeichnet.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 5.26$ (s, 1H, H_γ), 4.29 (dd, 1H, $^3J = 7.9$ Hz, $^3J = 7.1$ Hz, H_α), 3.68 (s, 3H, OMe), 3.65* (s, 3H OMe), 3.62 (m, 2H, H_δ), 3.25 (s, 3H, OMs), 2.62-2.55 (m, 1H, H_β), 2.25-2.16 (m, 1H, H_β), 1.40* (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.34 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 78.7$ (C_γ), 56.8 (C_α), 52.1 (C_δ), 51.8 (-OCH₃), 37.4 (-OSO₂-CH₃), 36.0 (C_β), 27.6 (-C(CH₃)₃) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{NO}_7\text{S}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 346.0928, gef.: 346.0942.



6.3.3.2 Darstellung von *N*-Boc-(4*S*)-thioacetyl-L-Prolinmethylester (SLD375/ASSL28-2)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Boc-L-Hyp(OMs)-OMe	323.36	23.2	1.00	7.51	
Kaliumthioacetat	114.21	46.5	2.00	5.31	
DMF					180

Durchführung:

Boc-Hyp(OMs)-OMe (7.51 g, 23.3 mmol, 1.00 eq.) wurde in 180 mL DMF gelöst. Unter Rühren wurde Kaliumthioacetat (5.31 g, 46.5 mmol, 2.00 eq.) hinzugegeben und die Lösung wurde für 24 h bei 70 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde bei 40 °C abkondensiert und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/EtOAc 1:1) aufgereinigt. Das Produkt **137** wurde als braun-rötliche viskose Flüssigkeit (5.73 g, 18.9 mmol, 82%) erhalten.

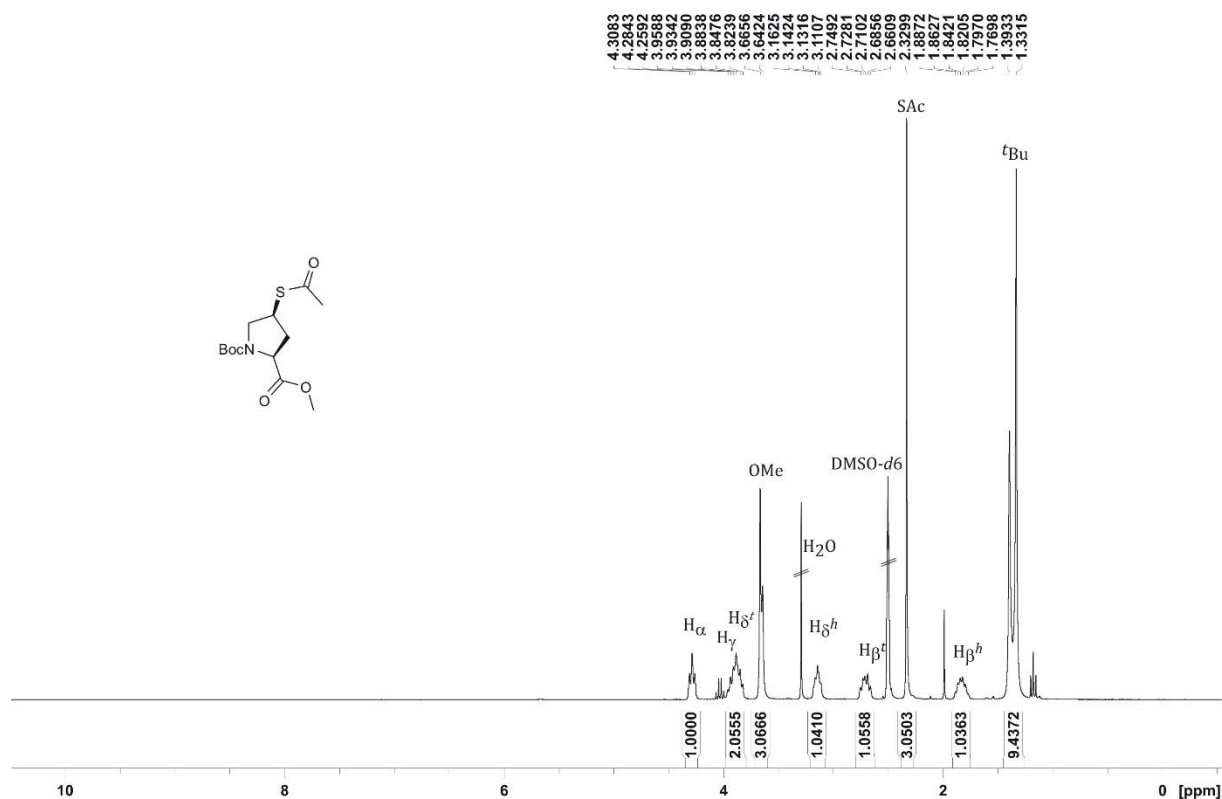
DC: $R_f = 0.67$ (Cyclohexan/Essigester 3:1)

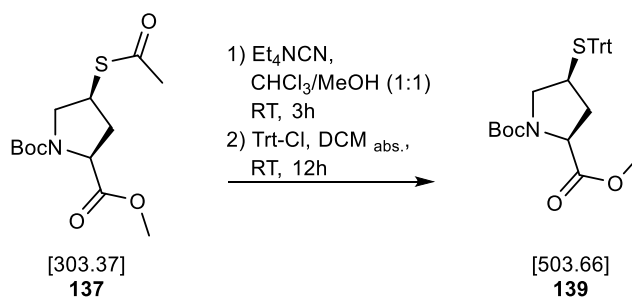
Auf Grund der *cis/trans*-Isomerie der Carbamat-Schutzgruppe ergeben sich für manche Protonen doppelte Signalsätze. Die chemischen Verschiebungen des Konformers im Unterschuss wird im Folgenden mit * gekennzeichnet.

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 4.28$ (t, 1H, $^3J = 6.9$ Hz, H_α), 3.96-3.82 (m, 2H, H_γ , H_{δ^t}), 3.66 (s, 3H, OCH_3), 3.64 (s, 3H, OCH_3), 3.18-3.10 (m, 1H, H_{δ^h}), 2.76-2.64 (m, 1H, H_{β^t}), 2.32 (s, 3H, SAC), 1.88-1.76 (m, 1H, H_{β^h}), 1.39* (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.32 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 57.7$ (C_α), 51.7 ($-\text{OCH}_3$), 51.4 (C_δ), 38.2 (C_γ), 35.2 (C_β), 30.2 ($-\text{SCOCH}_3$), 27.6 ($-\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{NO}_5\text{S}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 326.1033, gef.: 326.1035.



6.3.3.3 Darstellung von *N*-Boc-(4*S*)-thiotrityl-L-Prolinmethylester (SLD361/376/407)

Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [mg]	V [mL]
Boc-ThP(SAc)-OMe	303.37	2.27	1.00	690	
Tetraethylammoniumcyanid	156.27	1.14	0.50	178	
Chloroform					15.0
MeOH					15.0
Trithylchlorid	278.78	2.72	1.20	758	
$\text{DCM}_{(\text{abs.})}$					10.0

Durchführung:

Boc-ThP(SAc)-OMe (690 mg, 2.27 mmol, 1.00 eq) wurde unter Schutzgas in einem 1:1 Gemisch aus Chloroform und Methanol gelöst und mit Tetraethylammoniumcyanid (178 mg, 1.14 mmol, 0.50 eq) versetzt. Es wurde für 3 h bei RT rühren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde mit 15 mL dest. Wasser verdünnt und drei Mal mit je 30 mL Chloroform extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer ges. Ammoniumchlorid-Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernen und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Das erhaltene freie Thiol wurde ohne weitere Aufreinigung unter Schutzgas mit Trithylchlorid (758 mg, 2.72 mmol, 1.20 eq) versetzt und mit 10 mL $\text{DCM}_{(\text{abs.})}$ gelöst und über Nacht bei RT rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/EtOAc, 3:1) aufgereinigt. Das Produkt **139** (490 mg, 0.97 mmol, 43% über zwei Stufen) wurde als farbloser Feststoff erhalten.

Röntgenkristallstrukturanalyse: s. Anhang

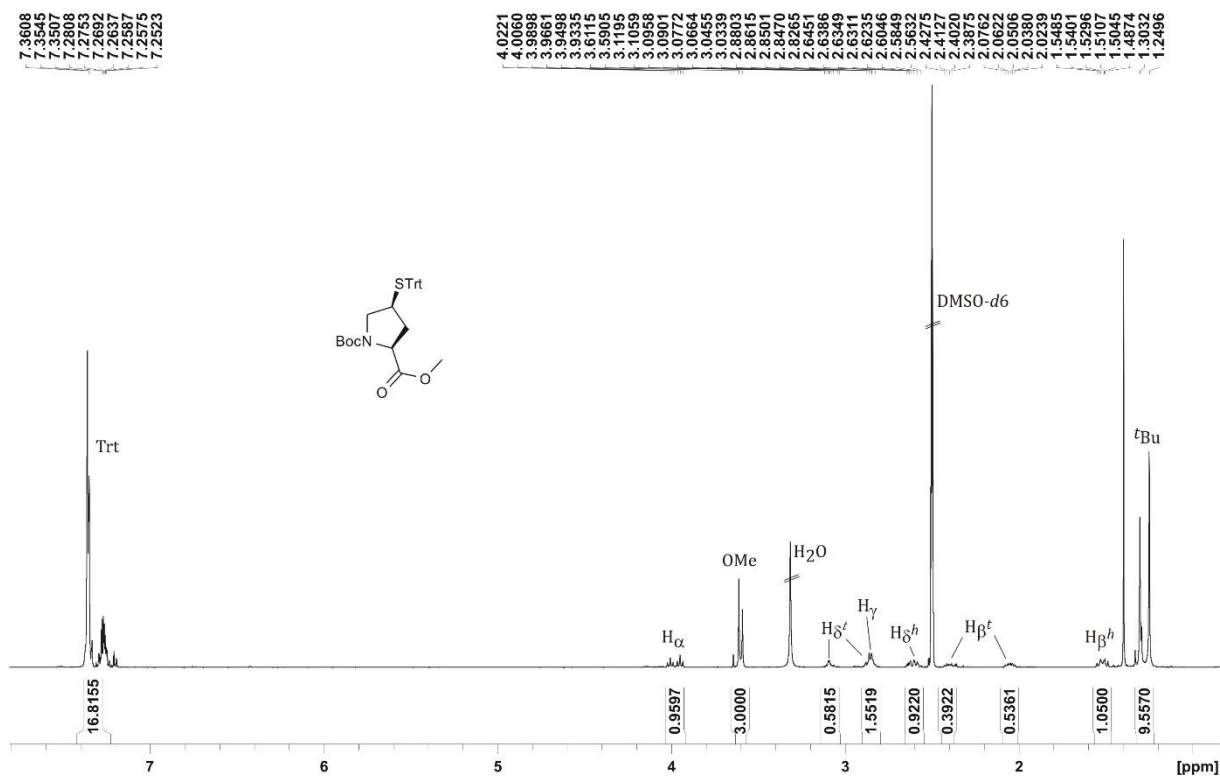
DC: R_f = 0.40 (Cyclohexan/Essigester 3:1)

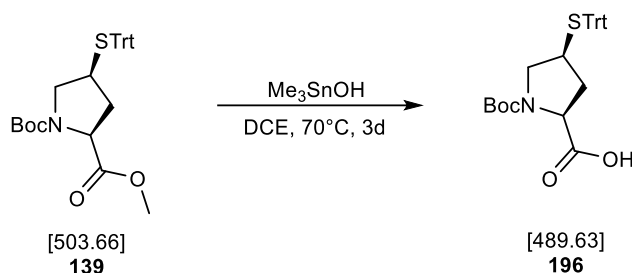
Auf Grund der *cis/trans*-Isomerie der Carbamat-Schutzgruppe ergeben sich für manche Protonen doppelte Signalsätze. Die chemischen Verschiebungen des Konformers im Unterschuss wird im Folgenden mit * gekennzeichnet.

¹H-NMR: 500 MHz, DMSO-*d*₆; δ = 7.39-7.18 (m, 15H, Trt), 4.00* (t, 1H, ³J = 8.1 Hz, H_α), 3.95 (t, 1H, ³J = 8.2 Hz, H_α), 3.61 (s, 3H, OCH₃), 3.59 (s, 3H, OCH₃), 3.11-3.04 (m, 1H, H_δ^t), 2.88-2.82 (m, 2H, H_γ, H_δ^{t*}), 2.64-2.56 (m, 1H, H_δ^h), 2.42-2.38* (m, 1H, H_β^t), 2.07-2.02 (m, 1H, H_β^t), 1.55-1.48 (m, 1H, H_β^h), 1.33* (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.26 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

¹³C-NMR: 125 MHz, DMSO-*d*₆; δ = 128.5 (Trt), 126.7 (Trt), 57.7 (C_α), 56.9 (C_α), 52.1 (C_δ), 51.7 (OCH₃), 51.7 (C_δ), 40.4 (C_γ), 36.8 (C_β), 35.5 (C_β), 27.7 (C(CH₃)₃), 27.5 (C(CH₃)₃) ppm.

HR-MS (ESI): für [C₃₀H₃₃NO₄S]⁺ (M+Na); ber.: 526.2023, gef.: 526.2026.



6.3.3.4 Darstellung von *N*-Boc-(4*S*)-thiotrityl-L-Prolin (SLD388)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Boc-Thp(STrt)-OMe	503.66	0.48	1.00	240	
Trimethylzinnhydroxid		2.76	5.76	500	
Dichlorethan					20.0

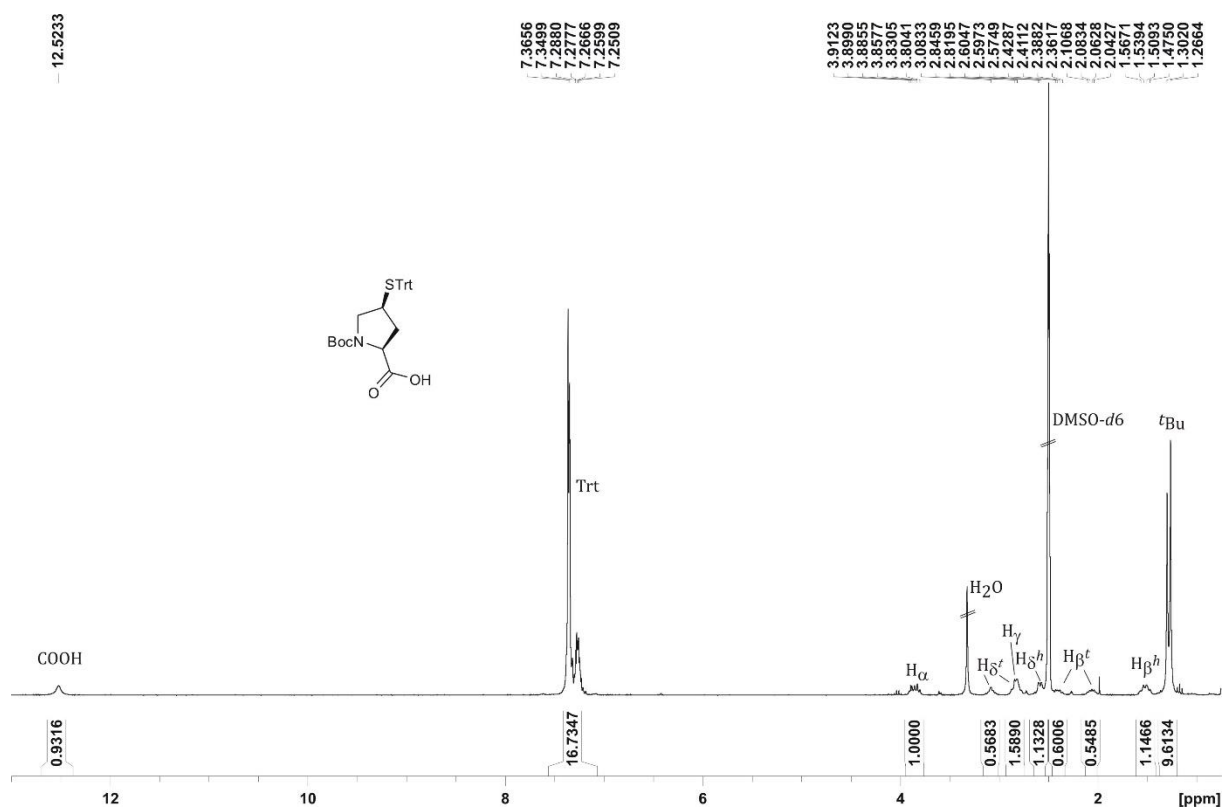
Durchführung:

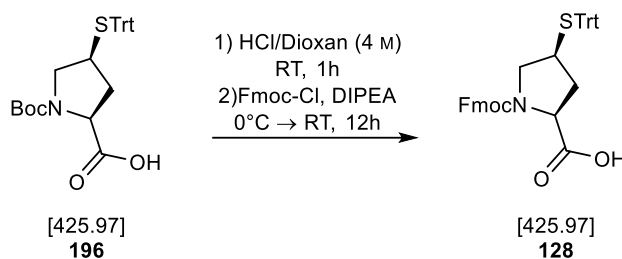
Die vollständig geschützte Aminosäure Boc-Thp(STrt)-OMe (240 mg, 0.48 mmol, 1.00 eq) wurde in 20 mL Dichlorethan gelöst und nach der Zugabe von Me₃SnOH (500 mg, 2.76 mmol, 5.76 eq) auf 70 °C erhitzt. Es wurden drei Tage tagsüber bei 70 °C und über Nacht bei RT gerührt. Die Reaktionslösung wurde mit 70 mL EtOAc verdünnt und drei Mal mit je 30 mL einer 0.2 N HCl-Lsg. gewaschen. Es wurde anschließend mit ges. NaCl-Lsg. gewaschen und die organische Phase über Magnesiumsulfat getrocknet. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Das Produkt **196** (233 mg, 0.48 mmol, quant.) wurde als gelber Feststoff erhalten.

Auf Grund der *cis/trans*-Isomerie der Carbamat-Schutzgruppe ergeben sich für manche Protonen doppelte Signalsätze. Die chemischen Verschiebungen des Konformers im Unterschuss wird im Folgenden mit * gekennzeichnet.

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 7.38-7.24 (m, 15H, Trt), 3.88* (t, 1H, 3J = 8.4 Hz, H_α), 3.82 (t, 1H, 3J = 8.0 Hz, H_α), 3.07 (m, 1H, H_δ^t), 2.86-2.76 (m, 2H, H_γ , H_δ^{t*}), 2.61-2.54 (m, 1H, H_δ^h), 2.43-2.38* (m, 1H, H_β^t), 2.07-2.02 (m, 1H, H_β^t), 1.55-1.47 (m, 1H, H_β^h , H_β^{h*}), 1.29* (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.26 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 128.2 (Trt), 126.7 (Trt), 57.6 (C_α), 56.9* (C_α), 52.1 (C_δ), 51.7* (C_δ), 40.4 (C_γ), 36.8 (C_β), 35.7* (C_β), 27.7* ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.5 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.



6.3.3.5 Darstellung von *N*-Fmoc-(4*S*)-thiotrityl-L-Prolin (SLD390-2)

Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [mg]	V [mL]
Boc-ThP(STrt)-OH	425.97	0.47	1.00	230	
HCl in Dioxan (4 M)					8.00
Fmoc-Cl	258.70	0.47	1.00	121	
DIPEA	129.25	1.41	3.00	182	0.25
DCM _(abs.)					10.0

Durchführung:

Die geschützte Aminosäure **196** (230 mg, 0.47 mmol, 1.00 eq) wurde unter Schutzgas in 8.0 mL einer 4 M HCl in Dioxan gelöst und für 1 h rühren gelassen. Das überschüssige HCl wurde durch einen Argonstrom aus der Lösung ausgetrieben und anschließend das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Der Rückstand wurde am Feinvakuum getrocknet und anschließend mit Fmoc-Cl (121 mg, 0.47 mmol, 1.00 eq) unter Schutzgas vorgelegt und in 10.0 mL DCM_{abs.} gelöst. Es wurde auf 0 °C gekühlt und mit DIPEA (0.25 mL, 1.41 mmol, 3.00 eq) versetzt. Nach langsamem Erwärmen auf RT wurde über Nacht bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 5:1) aufgereinigt. Das Produkt **128** konnte als farbloser Feststoff (200 mg, 0.33 mmol, 69%) isoliert werden.

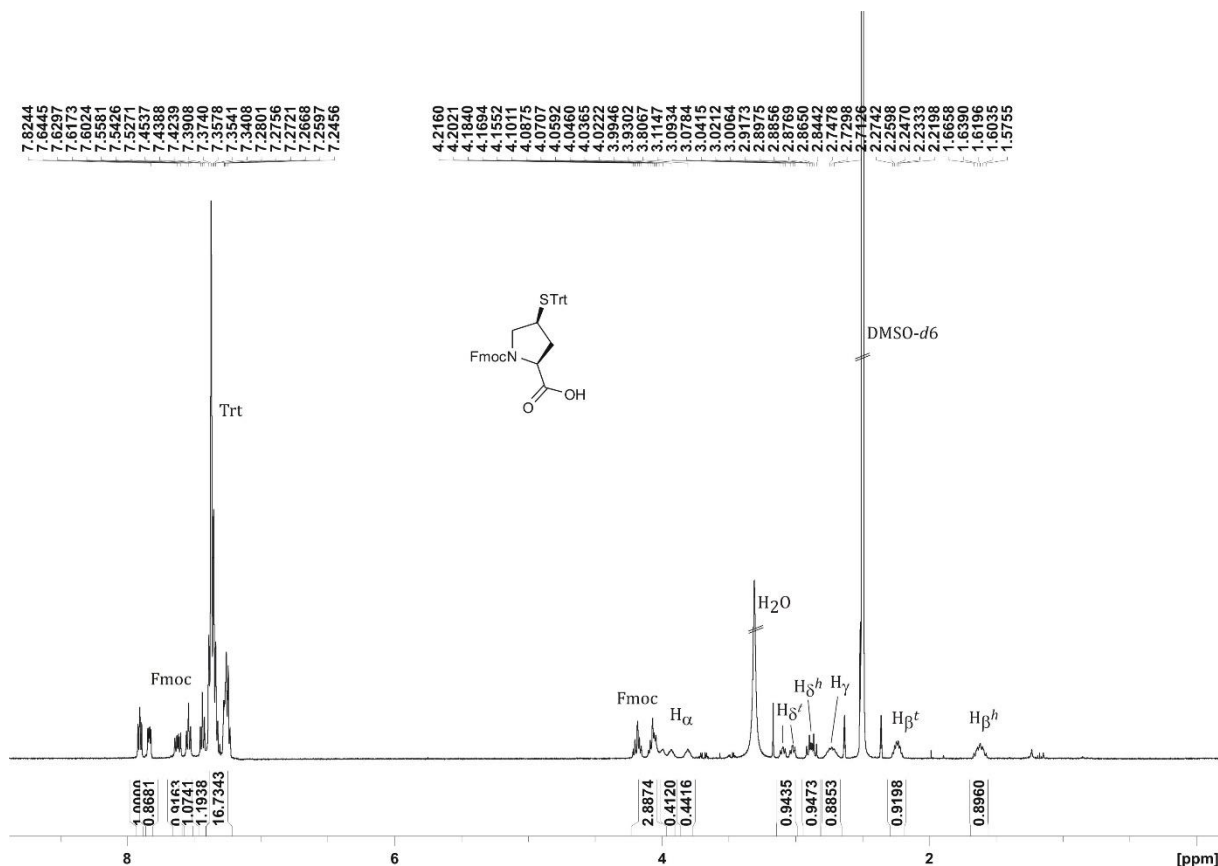
DC: $R_f = 0.59$ (DCM/MeOH 5:1)

Auf Grund der *cis/trans*-Isomerie der Carbamat-Schutzgruppe ergeben sich für manche Protonen doppelte Signalsätze. Die chemischen Verschiebungen des Konformers im Überschuss wird im Folgenden mit * gekennzeichnet.

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.90$ (t, 1H, $^3J = 6.7$ Hz, Fmoc), 7.83* (d, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.62* (d, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.54 (t, 1H, $^3J = 7.7$ Hz, Fmoc), 7.44* (t, 1H, $^3J = 7.4$ Hz, Fmoc), 7.39-7.24 (m, 19H, Trt, Fmoc), 4.21-4.04 (m, 3H, Fmoc), 3.93* (t, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, H_α), 3.86 (t, 1H, $^3J = 7.1$ Hz, H_α), 3.09* (dd, 1H, $^2J = 10.5$ Hz, $^3J = 7.5$ Hz, H_{δ^t}), 3.02 (dd, 1H, $^2J = 10.1$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, H_{δ^t}) 2.91-2.84 (m, 1H, H_{δ^h}), 2.78-2.69 (m, 1H, H_γ), 2.27-2.20 (m, 1H, H_{β^t}), 1.66-1.57 (m, 1H, H_{β^h}) ppm.

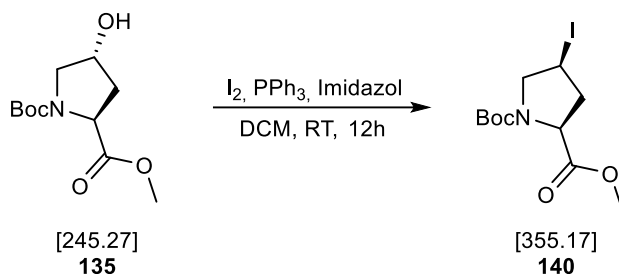
$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 129.4$ (Fmoc), 128.3 (Trt), 128.0 (Fmoc), 127.5 (Trt), 125.9, 125.5 (Fmoc), 120.5 (Fmoc), 120.4 (Fmoc), 67.0 (Fmoc- CH_2), 59.7* (C_α), 59.4 (C_α), 52.8* (C_δ), 52.6 (C_δ), 42.1 (Fmoc-CH), 41.1 (C_γ), 37.7 (C_β) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{39}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{S}]^+$ (M+Na); ber.: 634.2023, gef.: 634.2028.



6.3.4 Darstellung von *N*-Fmoc-(4*R*)-thiotrityl-L-Prolin (Fmoc-Thp(Trt)-OH)

6.3.4.1 Darstellung von *N*-Boc-(4*S*)-Iod-L-prolinmethylester (MPV019)



Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Boc-Hyp-OMe	245.27	18.0	1.00	4.41	
Iod	253.81	53.9	3.00	14.1	
Triphenylphosphin	262.28	53.9	3.00	13.5	
Imidazol	68.08	90.0	5.00	6.12	
DCM					150

Durchführung:

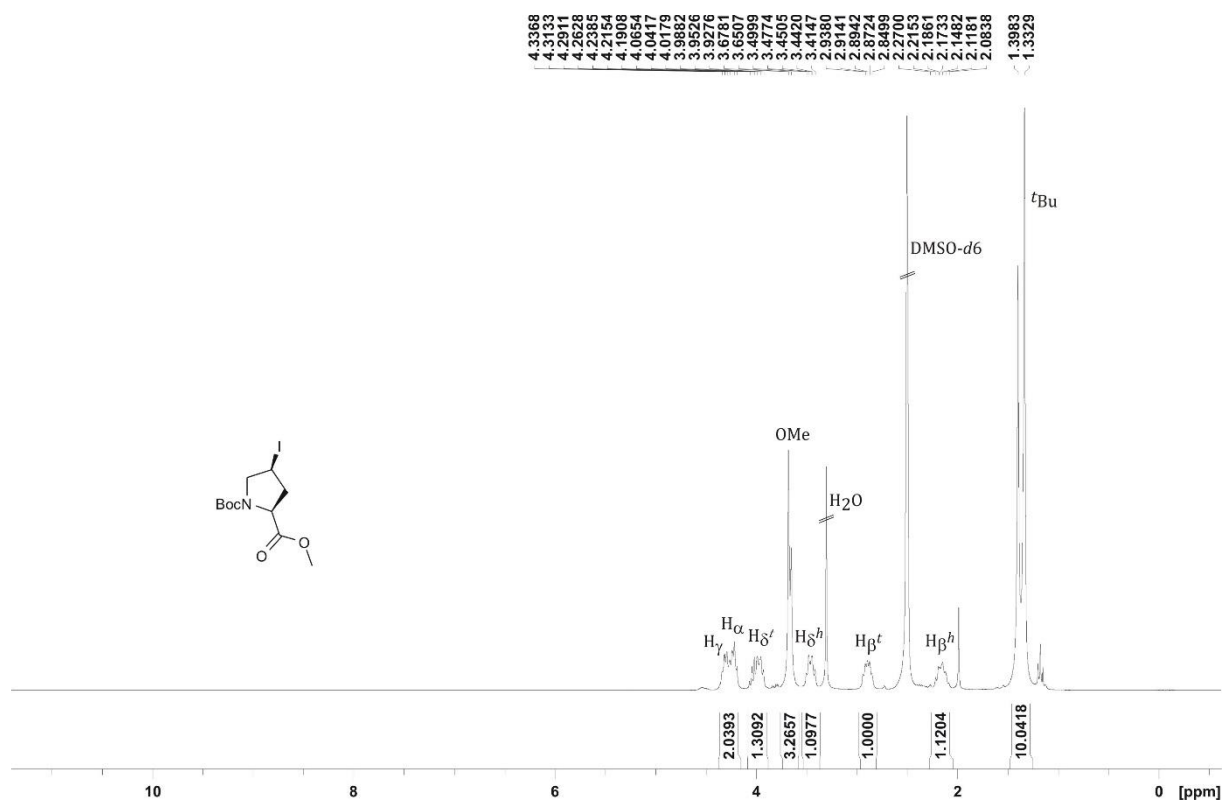
Boc-4(*S*)-Iod-L-prolinmethylester wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA10** dargestellt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/EtOAc, 1:1) aufgereinigt. Die Titelverbindung **140** wurde als farbloser Feststoff (5.59 g, 17.3 mmol, 96%) erhalten.

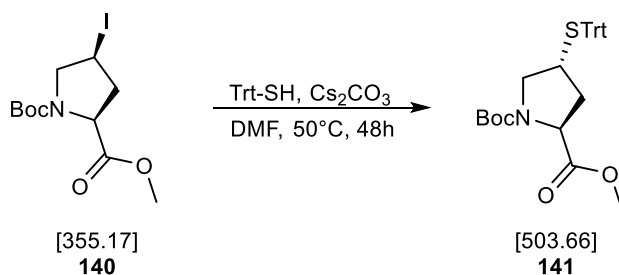
DC: $R_f = 0.75$ (Cyclohexan/Essigester 1:1)

Auf Grund der *cis/trans*-Isomerie der Carbamat-Schutzgruppe ergeben sich für manche Protonen doppelte Signalsätze. Die chemischen Verschiebungen des Konformers im Überschuss wird im Folgenden mit * gekennzeichnet.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 4.33\text{--}4.19$ (m, 2H, H_α , H_γ), 4.06–3.92 (m, 1H, H_δ), 3.65 (s, 3H, OCH_3), 3.50–3.41 (m, 1H, H_δ), 2.93–2.84 (m, 1H, H_β^t), 2.21–2.11 (m, 1H, H_β^h), 1.39* (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.33 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{11}\text{H}_{18}\text{INO}_4]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 378.0176, gef.: 378.0173.



6.3.4.2 Darstellung von *N*-Boc-(4*R*)-thiotritlyl-L-Prolinmethylester (SLD368)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Boc-L-Iodprolinmethylester	355.17	2.82	1.00	1.00	
Tritylmercaptan	276.40	5.63	2.00	1.55	
Cäsiumcarbonat	325.82	5.63	2.00	1.83	
DMF					40

Durchführung:

Das Iodprolin (1.00 g, 2.82 mmol, 1.00 eq) wurde in 40 mL DMF gelöst und mit Trithylmercaptan (1.55 g, 5.61 mmol, 2.00 eq) und Cäsiumcarbonat (1.83 g, 5.62 mmol, 2.00 eq) versetzt. Die Reaktionslösung wurde für 48 h bei 50 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde bei 40 °C abkondensiert und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/EtOAc, 3:1) aufgereinigt. Das Produkt **141** (1.00 g, 1.99 mmol, 70%) wurde als farbloses Öl erhalten.

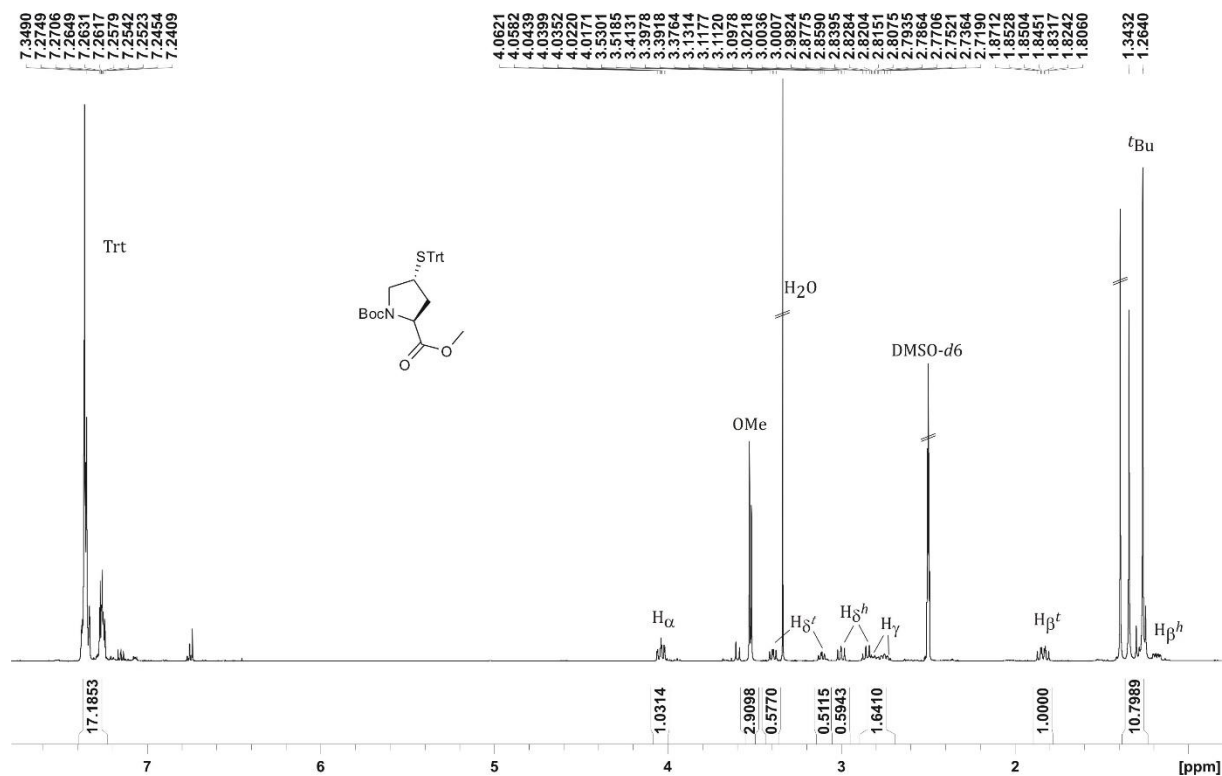
DC: $R_f = 0.40$ (Cyclohexan/Essigester 3:1)

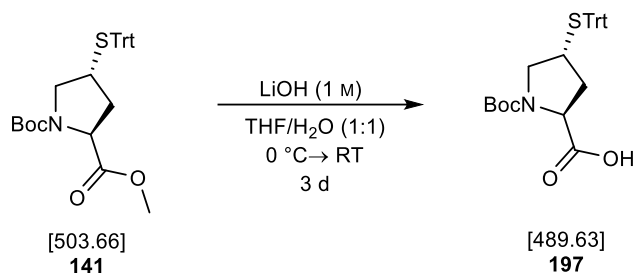
Auf Grund der *cis/trans*-Isomerie der Carbamat-Schutzgruppe ergeben sich für manche Protonen doppelte Signalsätze. Die chemischen Verschiebungen des Konformers im Überschuss wird im Folgenden mit * gekennzeichnet.

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.37\text{--}7.24$ (m, 15H, Trt), 4.05^* (dd, 1H, $^3J = 9.1$ Hz, $^3J = 2.0$ Hz, H_α), 4.03 (dd, 1H, $^3J = 9.0$ Hz, $^3J = 2.4$ Hz, H_α), 3.53 (s, 3H, OCH_3), 3.51^* (s, 3H, OCH_3), 3.39^* (dd, 1H, $^3J = 10.7$ Hz, $^3J = 7.7$ Hz, H_{δ^t}), 3.11 (dd, 1H, $^3J = 9.9$ Hz, $^3J = 7.0$ Hz, H_{δ^t}), 3.00^* (dd, 1H, $^3J = 10.7$ Hz, $^3J = 9.1$ Hz, H_{δ^h}), $2.87\text{--}2.71$ (m, 2H, H_δ , H_γ), $1.87\text{--}1.80$ (m, 1H, H_{β^t}), 1.34^* (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.26 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.18 (ddd, 1H, $^2J = 13.1$ Hz, $^3J = 6.3$ Hz, $^3J = 2.4$ Hz, H_{β^h}) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 128.7$ (Trt), 126.7 (Trt), 57.7 (C_α), 57.2^* (C_α), 51.7 (OCH_3), 51.2^* (C_δ), 51.0 (C_δ), 40.0 (C_γ), 36.6 (C_β), 36.3^* (C_β), 27.8^* ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 27.6 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{30}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{S}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 526.2023, gef.: 526.2025.



6.3.4.3 Darstellung von *N*-Boc-(4*R*)-thiotrityl-L-Prolin (SLD372/SLD394)

Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Boc-ThP(STrt)-OMe	503.66	1.59	1.00	0.80	
LiOH (1 M)	40.0	6.35	4.00		6.35
THF					20.0
H ₂ O					13.0

Durchführung:

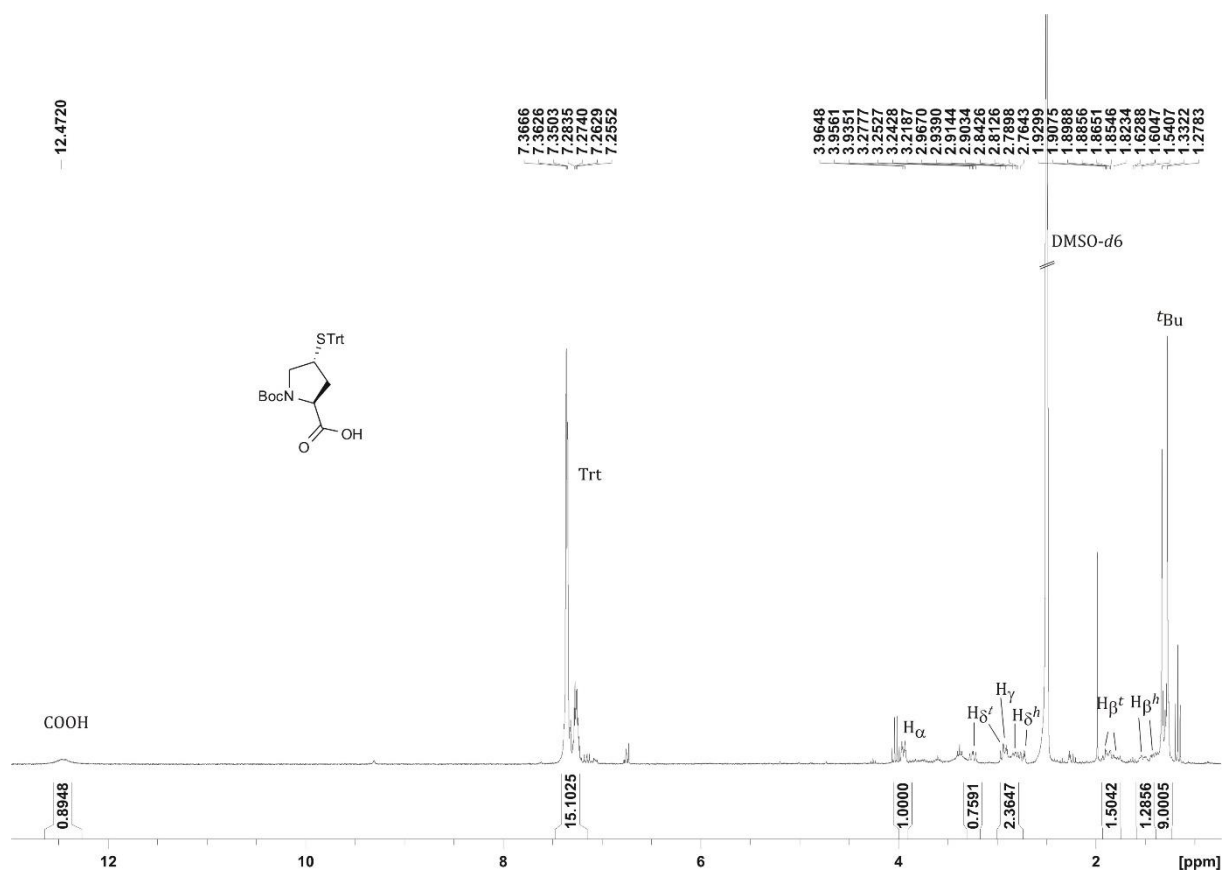
Die vollständig geschützte Aminosäure **141** wurde in 20.0 mL THF gelöst und mit 13.0 mL dest. Wasser verdünnt. Es wurde auf 0 °C gekühlt und eine 1 m LiOH-Lösung (6.35 mL, 6.35 mmol, 4.00 eq) zugetropft. Nach erwärmen auf RT wurde für 3 d rühren gelassen. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0 °C gekühlt und mit einer 1 N HCl-Lösung ein pH-Wert von 1 eingestellt. Es wurde drei Mal mit je 40.0 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde am Feinvakuum getrocknet. Das Produkt **197** wurde quantitativ als gelber Feststoff erhalten.

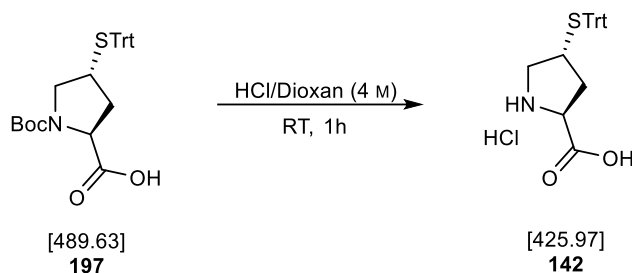
Auf Grund der *cis/trans*-Isomerie der Carbamat-Schutzgruppe ergeben sich für manche Protonen doppelte Signalsätze. Die chemischen Verschiebungen des Konformers im Unterschuss wird im Folgenden mit * gekennzeichnet.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, DMSO- d_6 ; δ = 12.47 (s, 1H, COOH), 7.40-7.22 (m, 15H, Trt), 3.96* (t, 1H, 3J = 2.6 Hz, H_α), 3.93 (t, 1H, 3J = 2.5 Hz, H_α), 3.25 (dd, 1H, 2J = 10.5 Hz, 3J = 7.2 Hz, H_δ^t), 2.99-2.75 (m, 2H, H_δ^h , H_γ), 1.94-1.72 (m, 1H, H_β^t , H_β^{t*}), 1.60-1.42 (m, 1H, H_β^h), 1.41 (ddd, 1H, 2J = 13.0 Hz, 3J = 6.7 Hz, 3J = 2.5 Hz, H_β^h), 1.33* (s, 9H, C(CH₃)₃), 1.28 (s, 9H, C(CH₃)₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, DMSO- d_6 ; δ = 128.4 (Trt), 126.7 (Trt), 57.5 (C_α), 51.2 (C_δ), 39.7 (C_γ), 36.5 (C_β), 35.8* (C_β), 27.8* (C(CH₃)₃), 27.5 (C(CH₃)₃) ppm.

HR-MS (ESI): für [C₂₉H₃₁NO₄S]⁺ (M+Na); ber.: 512.1866, gef.: 512.1868.



6.3.4.4 Darstellung von (4*R*)-thiotrityl-L-Prolin (SLD381)

Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Boc-ThP(STrt)-OH	489.63	0.88	1.00	0.43	
HCl in Dioxan (4 M)					10.0 mL

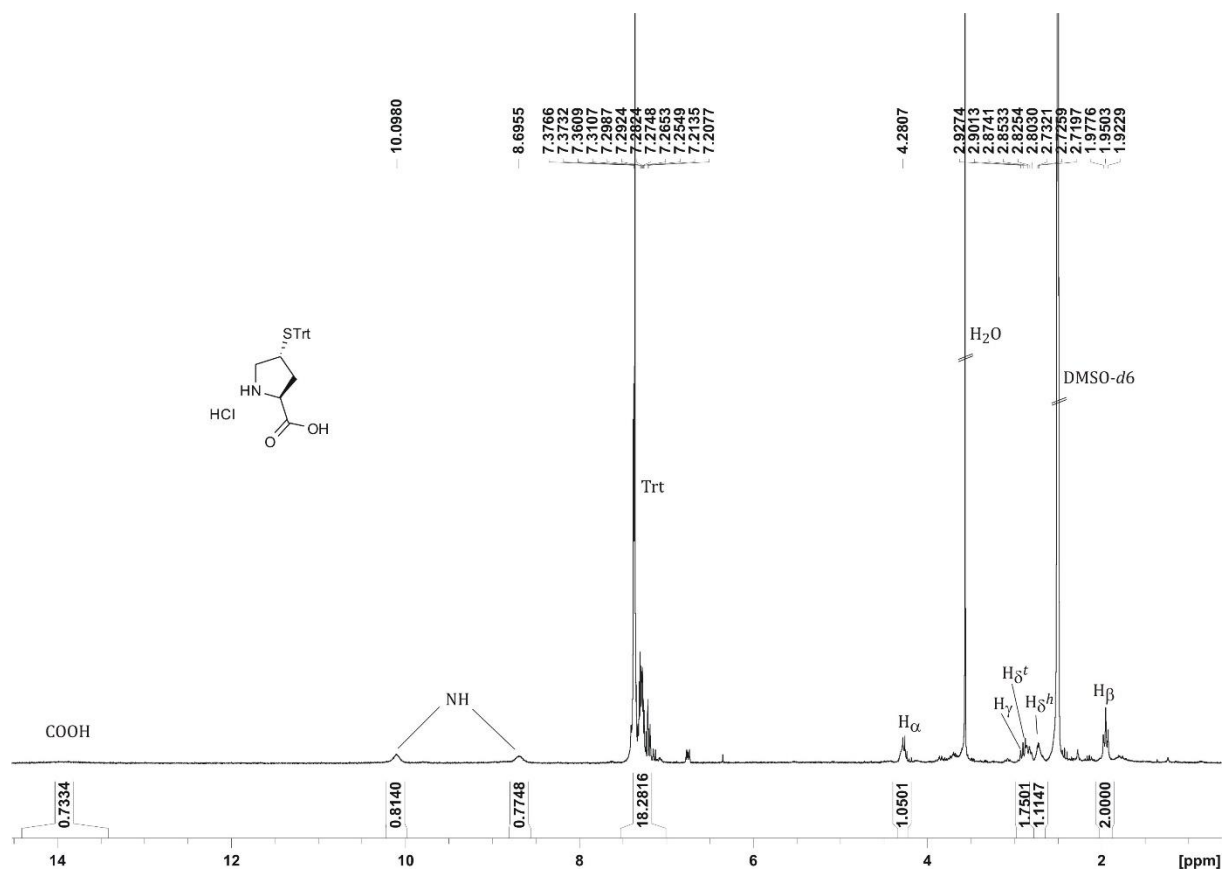
Durchführung:

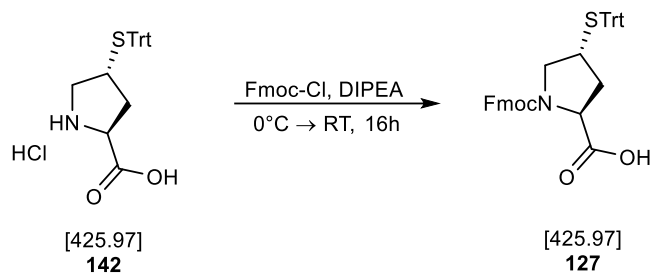
Die geschützte Aminosäure **197** (430 mg, 0.88 mmol, 1.00 eq) wurde unter Schutzgas in 10.0 mL einer 4 M HCl in Dioxan gelöst und für 1 h rühren gelassen. Das überschüssige HCl wurde durch einen Argonstrom aus der Lösung ausgetrieben und anschließend das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde am Feinvakuum getrocknet und ohne weitere Aufreinigung weiter umgesetzt. Das NMR-Spektrum zeigt eine quantitative Umsetzung zur Titelverbindung **142**.

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 13.92 (s, 1H, COOH), 10.09 (s, 1H, NH), 8.69 (s, 1H, NH), 7.40-7.24 (m, 15H, Trt), 4.33-4.23 (m, 1H, H_α), 2.95-2.80 (m, 2H, H_γ , H_δ^t), 2.76-2.65 (m, 1H, H_δ^h), 1.95 (t, 2H, 3J = 8.2 Hz, H_β) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 128.4 (Trt), 126.9 (Trt), 57.2 (C_α), 49.8 (C_δ), 39.5 (C_γ), 33.9 (C_β) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{NO}_2\text{S}]^+$ (M+Na); ber.: 412.1342, gef.: 412.1344.



6.3.4.5 Darstellung von *N*-Fmoc-(4*R*)-thiotrityl-L-Prolin (SLD383/SLD408)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
HN-ThP(STrt)-OH • HCl	425.97	0.54	1.00	0.23	
Fmoc-Cl	258.70	1.25	2.31	0.32	
DIPEA	129.29	3.74	6.93	0.48	0.65
DCM _(abs.)					10.0

Durchführung:

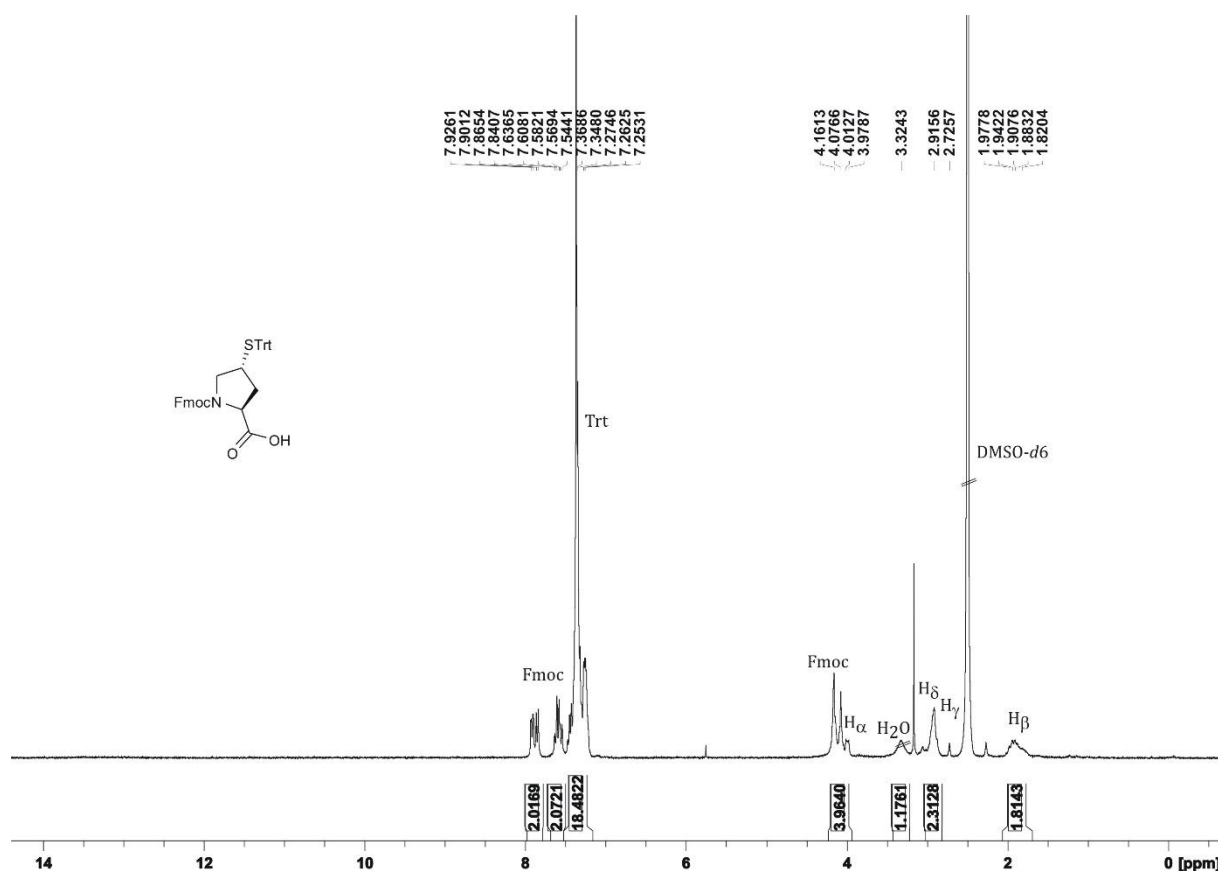
Das HCl-Salz des (4*R*)-Thiotrityl-prolins (230 mg, 0.54 mmol, 1.00 eq.) und Fmoc-Cl (323 mg, 1.25 mmol, 2.31 eq.) wurden unter Schutzgas vorgelegt und in 10.0 mL DCM_{abs.} gelöst. Es wurde auf 0 °C gekühlt und mit DIPEA (0.65 mL, 3.74 mmol, 6.93 eq.) versetzt. Nach erwärmen auf RT wurde für 16 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand säulenchromatographisch an Kieselgel (DCM/MeOH 5:1) aufgereinigt. Die Titelverbindung **127** wurde als hellgelber Feststoff (200 mg, 0.33 mmol, 60%) isoliert.

DC: $R_f = 0.60$ (DCM/MeOH 5:1)

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.92$ (d, $^3J = 7.6$ Hz, Fmoc), 7.85 (d, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, Fmoc), 7.62 (d, $^3J = 7.6$ Hz), 7.59 (d, $^3J = 7.6$ Hz, Fmoc), 7.55 (d, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, Fmoc), 7.46-7.22 (m, 18H, Fmoc, Trt), 4.20-4.05 (m, 3H, Fmoc), 3.98 (m, 1H, H_α), 3.11-3.01 (m, 1H, H_δ^f), 2.98-2.87 (m, 2H, H_γ , H_δ^h), 1.99- 1.89 (m, 1H, H_β^f), 1.86-1.74 (m, 1H, H_β^h) ppm.

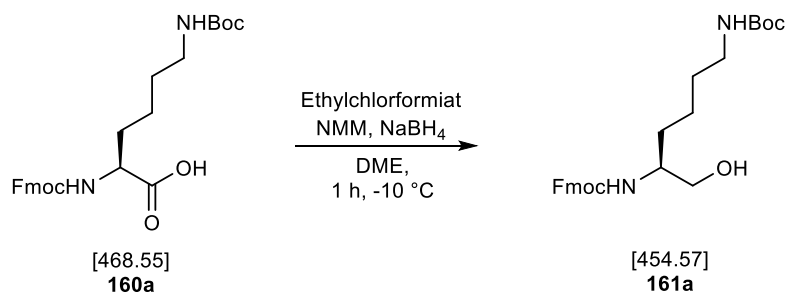
$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 128.3$ (Trt), 127.7 (Fmoc), 126.4 (Trt), 124.7, 119.7, 119.6, 66.1 (Fmoc- CH_2), 58.5 (C_α), 51.8 (C_δ), 40.0 (C_γ), 46.1 (Fmoc-CH), 35.9 (C_β) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{39}\text{H}_{33}\text{NO}_4\text{S}]^+$ (M+Na); ber.: 634.2023, gef.: 634.2029.



6.3.5 Darstellung von *N*-Fmoc-Lysinithiol (Fmoc-Lst(Boc)-SH)

6.3.5.1 Darstellung von *N*-Fmoc-Lysinol (SLD212)



Ansatz:

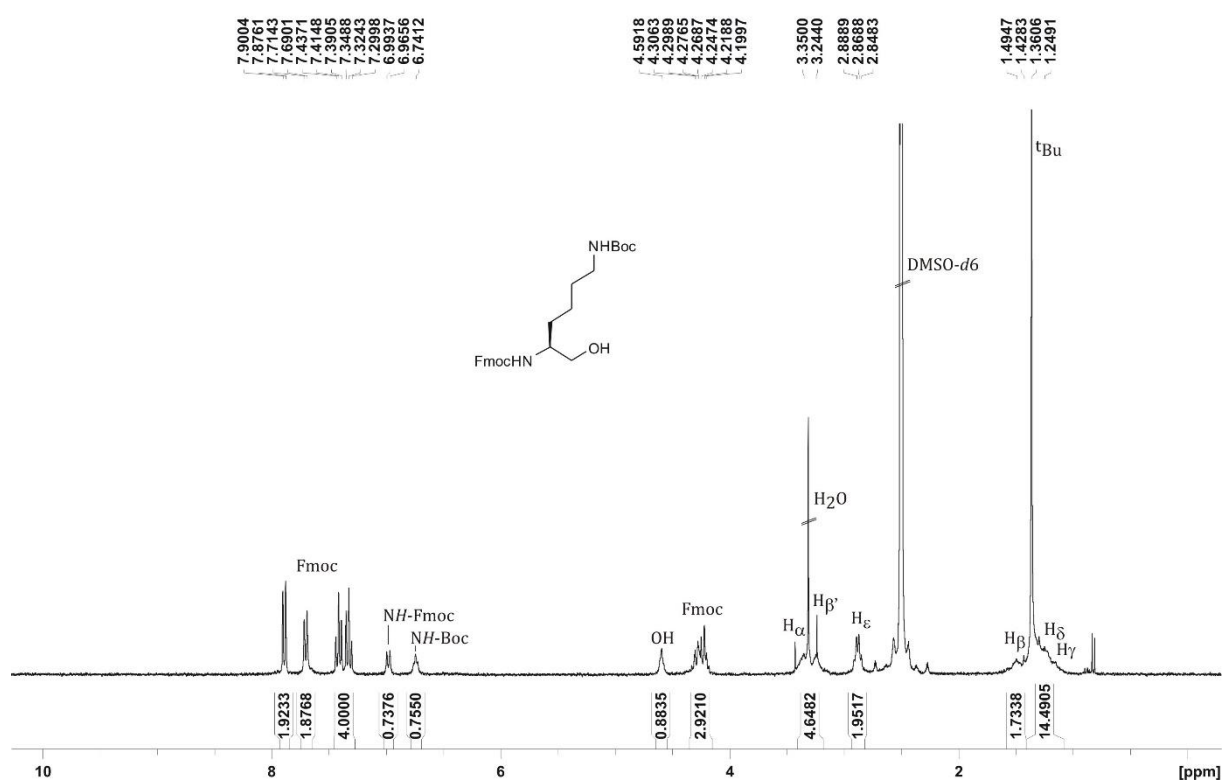
Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Fmoc-Lys(Boc)-OH	468.55	5.00	1.00	2.34	
<i>N</i> -Methylmorpholin	101.15	5.00	1.00	0.50	0.55
Chlorameisensäureethylester	108.52	5.00	1.00	0.54	0.48
Natriumborhydrid	37.83	7.50	1.50	0.28	
Dimethoxyethan					10.0
Wasser (dest.)					125

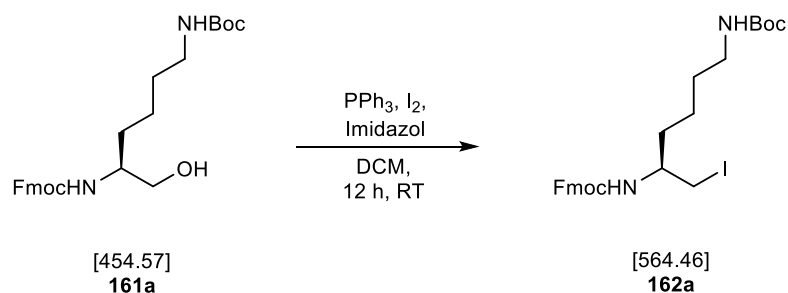
Durchführung:

Die Reduktion der Fmoc-geschützten Aminosäure **160a** wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA9** durchgeführt. Die Titelverbindung **161a** wurde als farbloser Feststoff (3.10 mmol, 62%) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 7.88 (d, 2H, 3J = 7.4 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, 3J = 7.4 Hz, Fmoc), 7.41 (t, 2H, 3J = 7.4 Hz, Fmoc), 7.32 (t, 2H, 3J = 7.4 Hz, Fmoc), 6.98 (d, 1H, 3J = 8.1 Hz, NH-Fmoc), 6.74 (t, 1H, 3J = 5.6 Hz, NH-Boc), 4.59 (t, 1H, 3J = 5.2 Hz, OH), 4.38-4.14 (m, 3H, H_α , H_β), 2.88 (m, 2H, H_ϵ), 1.61-1.03 (m, 15H, H_β , H_γ , H_δ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{26}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 477.2360, gef.: 477.2361.



6.3.5.2 Darstellung von *N*-Fmoc-Lysiniodid (ASSL011/ASSL04b)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Fmoc-Aminoalkohol	454.57	2.20	1.00	1.00	
Triphenylphosphin	262.28	6.60	3.00	1.73	
Iod	253.81	6.60	3.00	1.67	
Imidazol	68.08	11.0	5.00	0.75	
DCM _{abs.}					120

Durchführung:

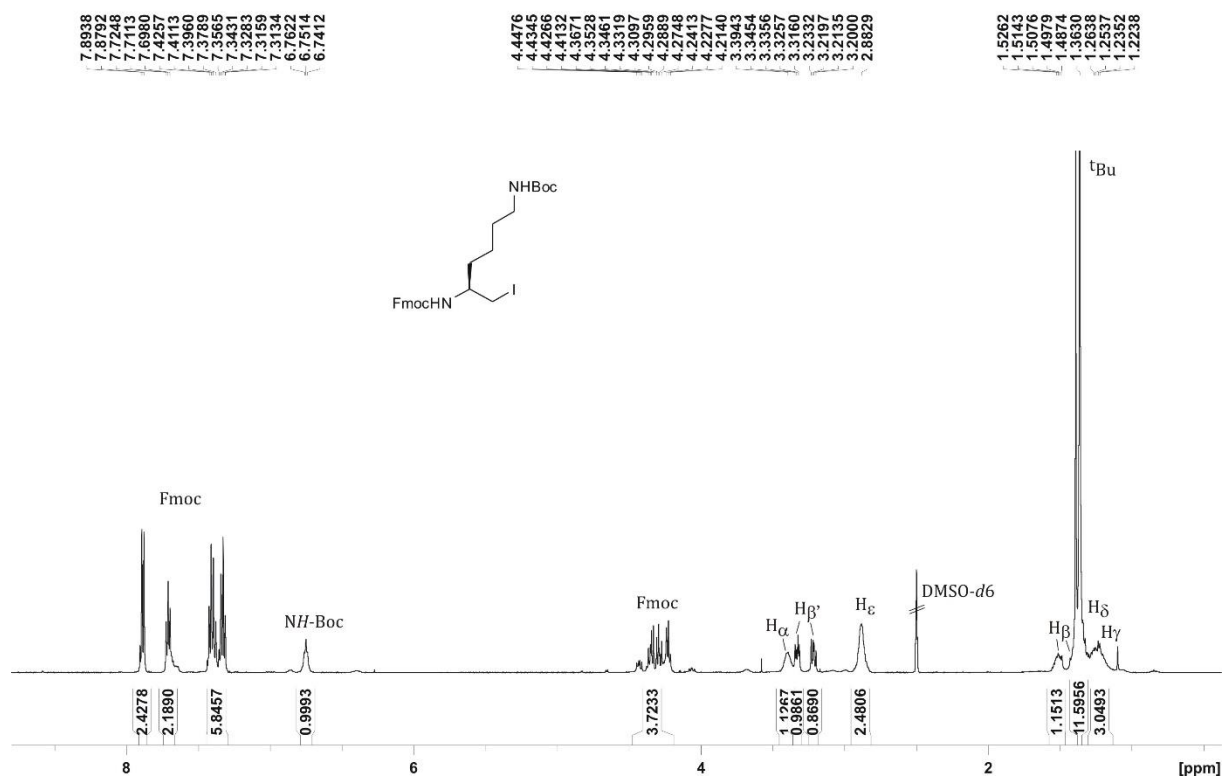
Die Einführung des Iods wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA10** durchgeführt. Die Titelverbindung **162a** wurde als farbloser Feststoff (0.62 mmol, 28%) erhalten.

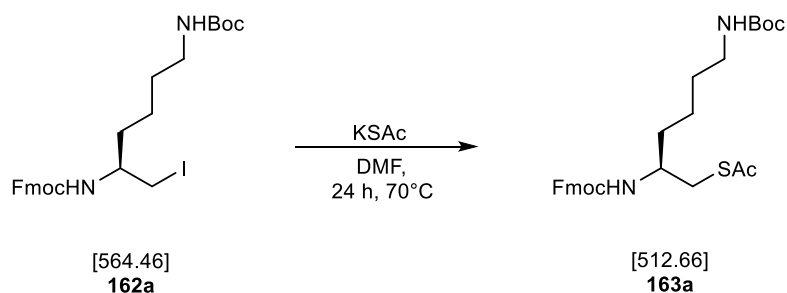
DC: $R_f = 0.26$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 3:1)

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.93\text{--}7.86$ (m, 2H, Fmoc), 7.75–7.64 (m, 2H, Fmoc), 7.47–7.29 (m, 5H, Fmoc, Fmoc-NH), 6.75 (t, 1H, $^3J = 5.5$ Hz, Boc-NH), 4.75–4.15 (m, 3H, Fmoc), 3.40 (m, 1H, H_α), 3.33 (dd, 1H, $^2J = 9.8$ Hz, $^3J = 5.1$ Hz, $H_{\beta'}$), 3.21 (dd, 1H, $^2J = 9.8$ Hz, $^3J = 6.6$ Hz, $H_{\beta'}$), 2.88 (m, 2H, H_ϵ), 1.50–1.41 (m, 2H, H_β), 1.37 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.34 (m, 2H, H_δ), 1.33–1.12 (m, 2H, H_γ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 127.3$, 127.0, 124.9, 119.9, 65.2 (Fmoc- CH_2), 51.6 (C_α), 46.6 (Fmoc-CH), 39.5 (C_ϵ), 33.1 (C_β), 29.1 (C_δ), 28.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22.6 (C_γ), 13.3 ($C_{\beta'}$) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{26}\text{H}_{33}\text{IN}_2\text{O}_4]^+$ (M+Na); ber.: 587.1377, gef.: 587.1385.



6.3.5.3 Darstellung von *N*-Fmoc-Lysinithioacetat (ASSL019)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Fmoc-Aminoiod	564.46	0.56	1.00	0.32	
Kaliumthioacetat	114.21	0.62	1.10	0.07	
DMF					25.0

Durchführung:

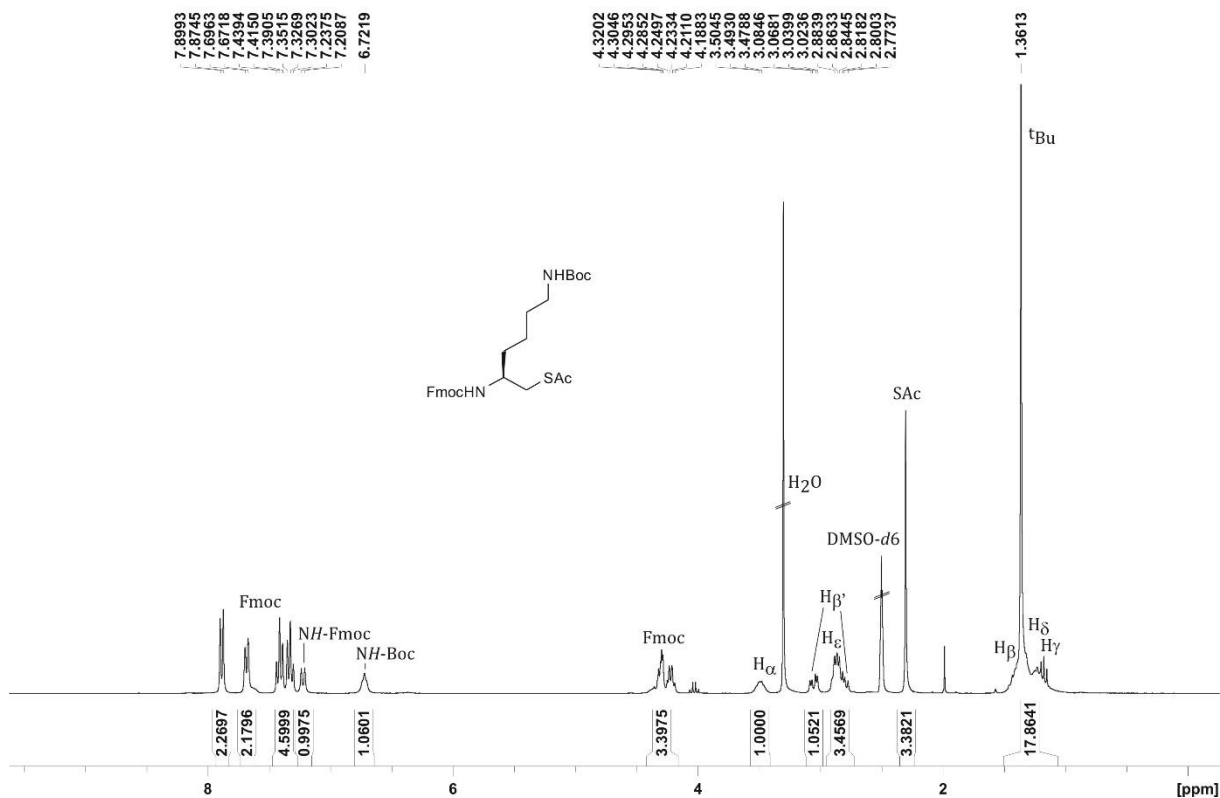
Das Fmoc-Aminoiodid **162a** (320 mg, 0.56 mmol, 1.00 eq) wurde in 25.0 mL DMF gelöst und mit Kaliumthioacetat (71.0 mg, 0.62 mmol, 1.10 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 70 °C rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde abkondensiert und der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit einer halb gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/EtOAc; 5:2) aufgereinigt. Die Titelverbindung **163a** wurde als oranger Feststoff (0.42 mmol, 75%) erhalten.

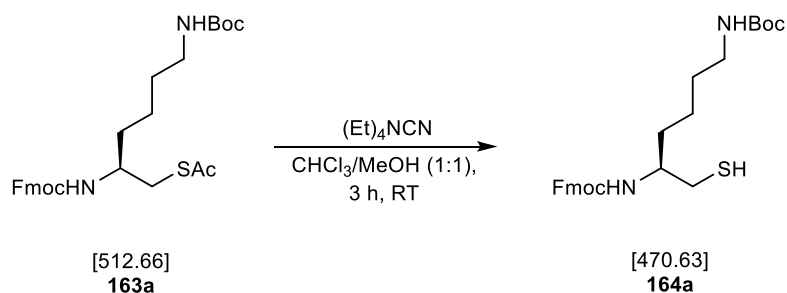
DC: $R_f = 0.36$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.88$ (d, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Fmoc), 7.68 (d, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Fmoc), 7.41 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Fmoc), 7.32 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Fmoc), 7.24 (d, 1H, $^3J = 8.7$ Hz, NH-Fmoc), 6.74 (t, 2H, $^3J = 5.4$ Hz, NH-Boc), 4.42-4.16 (m, 3H, Fmoc), 3.48 (m, 1H, H_α), 3.05 (dd, 1H, $^2J = 13.4$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, $H_{\beta'}$), 2.87 (m, 2H, H_ϵ), 2.80 (dd, 1H, $^2J = 13.4$ Hz, $^3J = 8.0$ Hz, $H_{\beta'}$), 2.30 (s, 3H, SAc), 1.44-1.37 (m, 2H, H_δ), 1.36 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.33-1.27 (m, 2H, H_δ), 1.24-1.15 (m, 2H, H_γ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 127.4$, 126.8, 124.9, 119.9, 64.9 (Fmoc- CH_2), 50.2 (C_α), 46.5 (Fmoc-CH), 39.7 (C_ϵ), 33.3 ($\text{C}_{\beta'}$), 33.0 (C_β), 30.4 (SCOCH $_3$), 28.9 (C_δ), 28.0 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22.6 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 535.2237, gef.: 535.2247.



6.3.5.4 Darstellung von *N*-Fmoc-Lysinithiol (ASSL023)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Fmoc-Aminothioacetat	512.66	0.40	1.00	0.20	
Tetraethylammoniumcyanid	156.27	0.20	0.50	0.03	
Chloroform					5.00
Methanol					5.00

Durchführung:

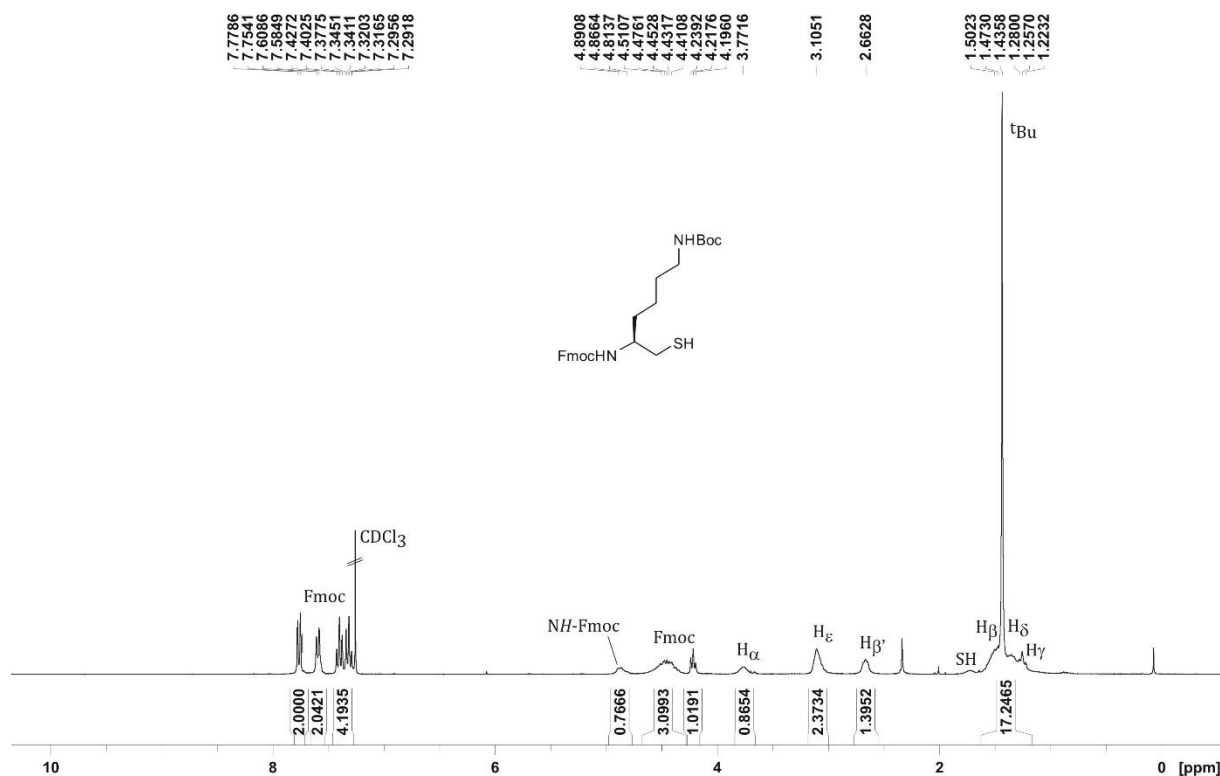
Die Spaltung des Thioacetates **163a** wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA11** durchgeführt. Die Titelverbindung **164a** wurde als farbloser Feststoff (0.40 mmol, 99%) erhalten.

DC: $R_f = 0.38$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, CDCl_3 ; $\delta = 7.76$ (d, 2H, $^3J = 7.5$ Hz Fmoc), 7.59 (d, 2H, $^3J = 7.5$ Hz Fmoc), 7.40 (t, 2H, $^3J = 7.5$ Hz Fmoc), 7.31 (t, 2H, $^3J = 7.5$ Hz Fmoc), 4.89 (d, 1H, $^3J = 8.5$ Hz Fmoc-NH), 4.68-4.16 (m, 3H, Fmoc), 3.76 (m, 1H, H_α), 3.10 (m, 2H, H_ϵ), 2.66 (m, 2H, $H_{\beta'}$), 1.75 (s, 1H, SH), 1.61-1.42 (m, 2H, H_δ), 1.55-1.44 (m, 2H, H_β), 1.43 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.41-1.26 (m, 2H, H_γ) ppm.

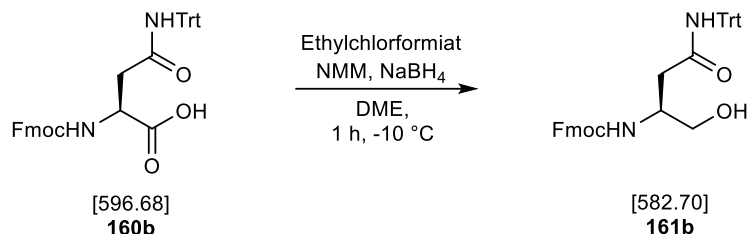
$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, CDCl_3 ; $\delta = 127.6$, 127.0, 124.9, 119.9, 66.4 (Fmoc- CH_2), 51.9 (C_α), 47.3 (Fmoc-CH), 40.0 (C_ϵ), 32.3 (C_β), 29.4 ($C_{\beta'}$), 29.7 (C_δ), 28.4 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 22.9 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}]^+$ (M+Na); ber.: 493.2131, gef.: 493.2140.



6.3.6 Darstellung von *N*-Fmoc-Asparaginthiol (Fmoc-Ant(Trt)-SH)

6.3.6.1 Darstellung von *N*-Fmoc-Asparaginol (SLD227)



Ansatz:

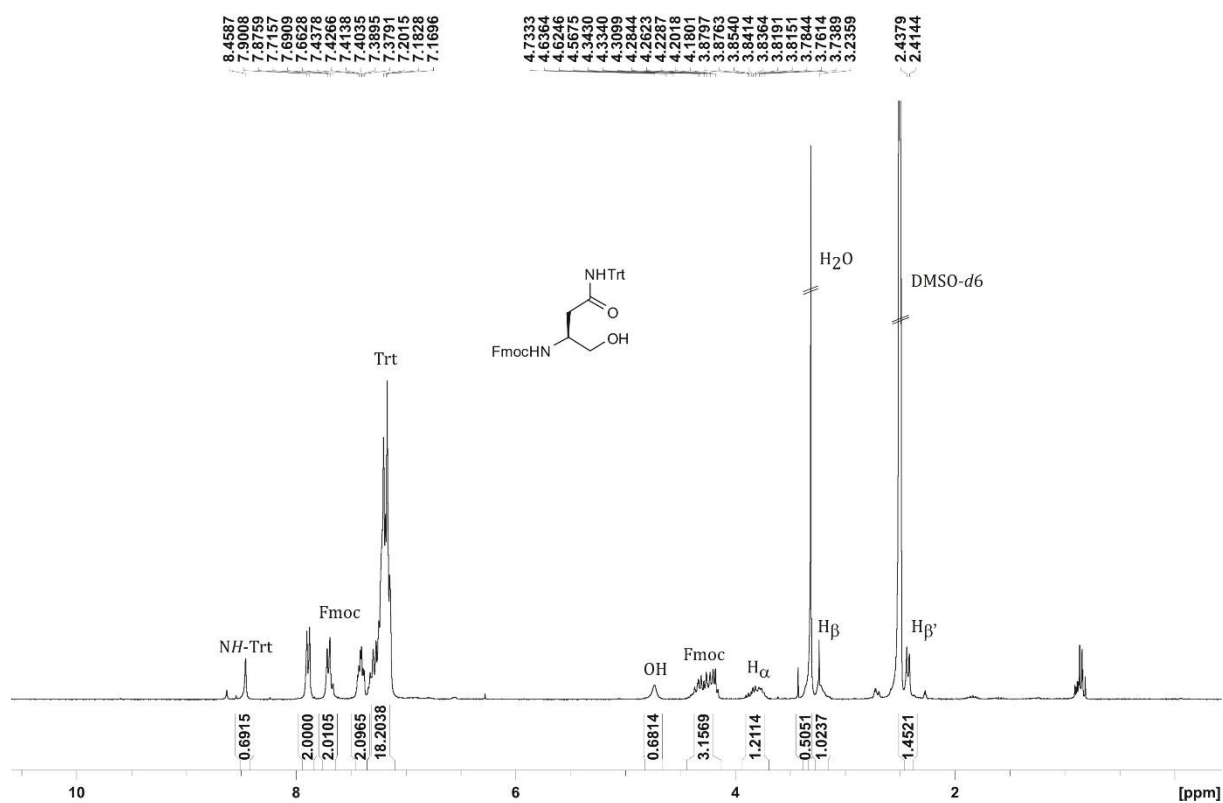
Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Fmoc-Aminosäure	596.68	5.00	1.00	2.98	
<i>N</i> -Methylmorpholin	101.15	5.00	1.00	0.50	0.55
Chlorameisensäureethylester	108.52	5.00	1.00	0.54	0.48
Natriumborhydrid	37.83	7.50	1.50	0.28	
Dimethoxyethan					10.0
Wasser (dest.)					150

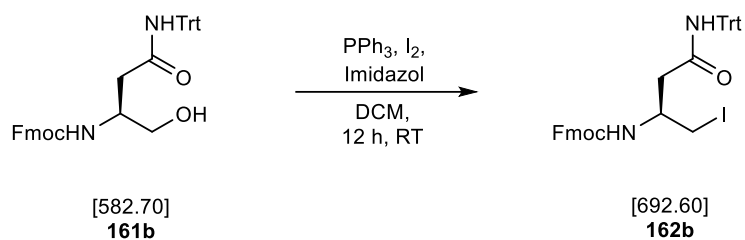
Durchführung:

Die Reduktion der Fmoc-geschützten Aminosäure **160b** wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA9** durchgeführt. Die Titelverbindung **161b** wurde als farbloser Feststoff erhalten (4.12 mmol, 82%).

^1H -NMR: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 8.46 (s, 1H, NHTrt), 7.88 (d, 2H, 3J = 7.6 Hz, Fmoc), 7.68 (t, 2H, 3J = 7.6 Hz, Fmoc), 7.44-7.25 (m, 2H, Fmoc), 7.25-7.12 (m, 17H, Fmoc, Trt), 4.73 (s, 1H, OH), 4.36-4.15 (m, 3H, Fmoc), 3.81 (m, 1H, H_α), 3.25-3.17 (m, 1H, H_β), 2.42 (d, 1H, 3J = 7.1 Hz, H_β) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 605.2402, gef.: 605.2402.



6.3.6.2 Darstellung von *N*-Fmoc-Asparaginiodid (ASSL012)

Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Fmoc-Aminoalkohol	582.70	1.72	1.00	1.00	
Triphenylphosphin	262.28	5.16	3.00	1.35	
Iod	253.81	5.16	3.00	1.34	
Imidazol	68.08	8.60	5.00	0.60	
DCM _{abs.}					50.0

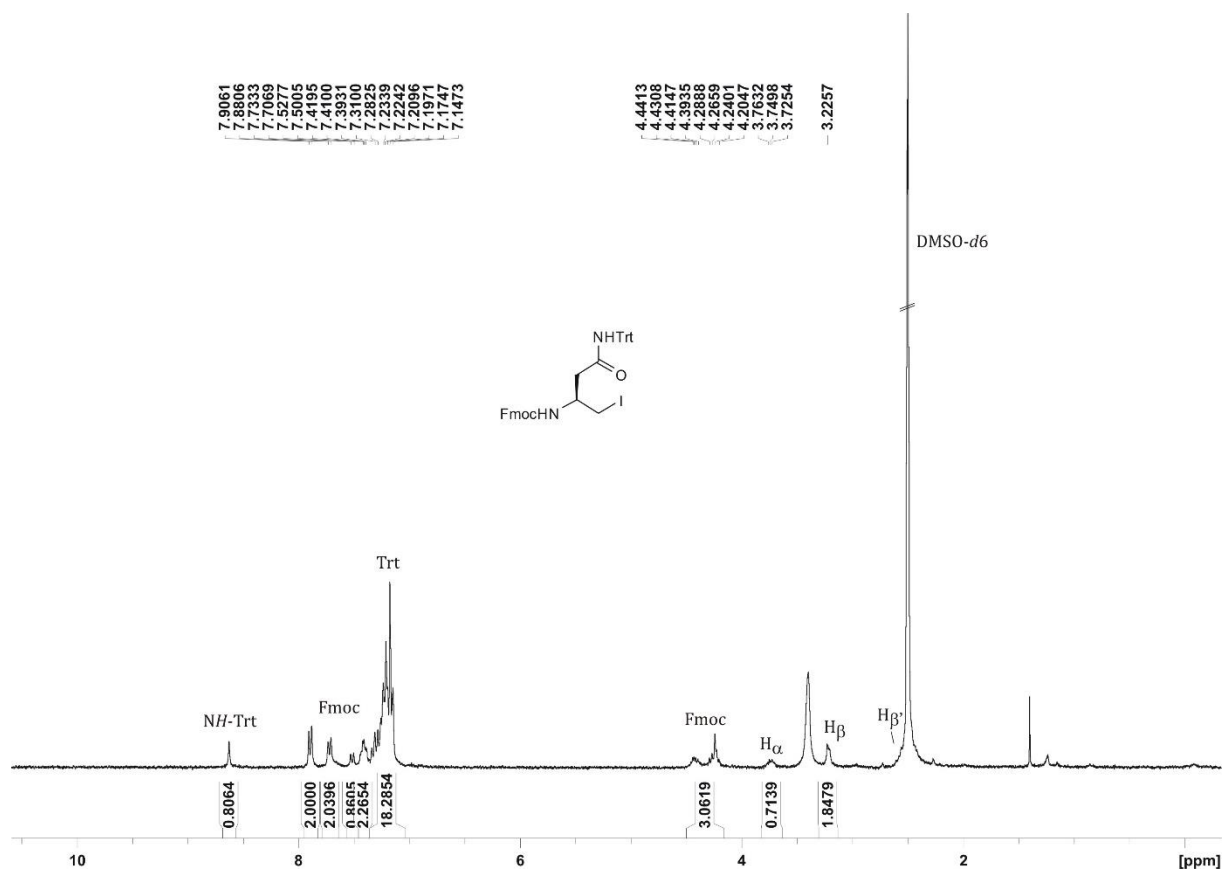
Durchführung:

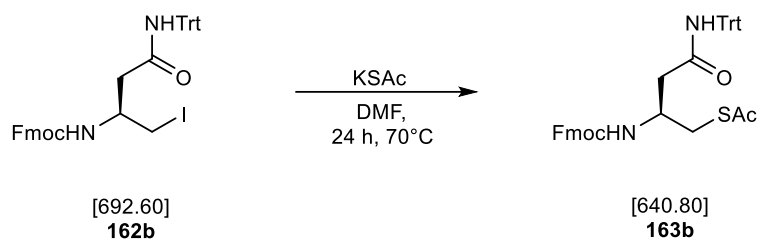
Die Einführung des Iods wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA10** durchgeführt. Die Titelverbindung **162b** wurde als Farbloser Feststoff (1.00 mmol, 58%) erhalten.

DC: $R_f = 0.28$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 3:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 8.63$ (s, 1H, NHTrt), 7.89 (d, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, Fmoc), 7.72 (d, 2H, $^3J = 7.6$ Hz, Fmoc), 7.53-7.18 (m, 19H, Fmoc, Trt), 4.47-4.20 (m, 3H, Fmoc), 3.72 (m, 1H, H_α), 3.21 (m, 2H, H_β) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{38}\text{H}_{33}\text{IN}_2\text{O}_3]^+ (\text{M}+\text{Na})$; ber.: 715.1428, gef.: 715.1444.



6.3.6.3 Darstellung von *N*-Fmoc-Asparaginthioacetat (ASSL020)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Fmoc-Aminoiodid	692.58	1.00	1.00	0.69	
Kaliumthioacetat	114.21	1.10	1.10	0.13	
DMF					13.0

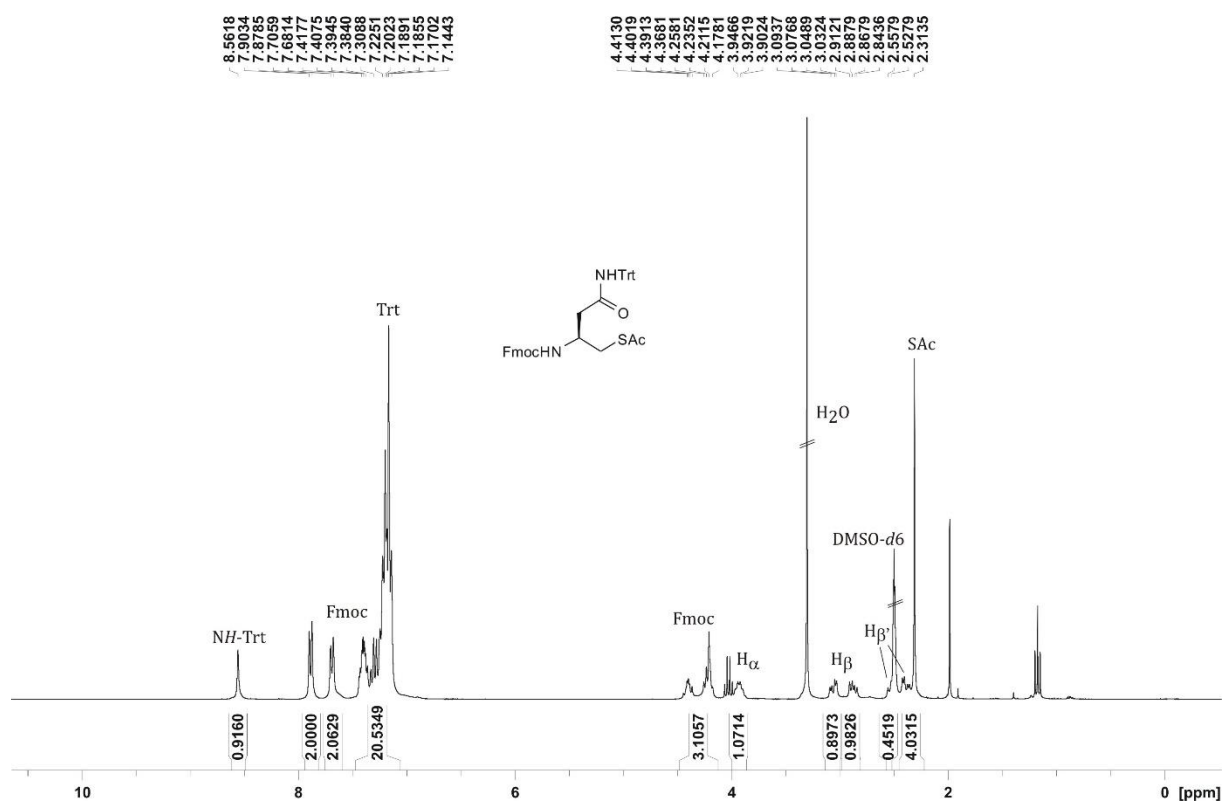
Durchführung:

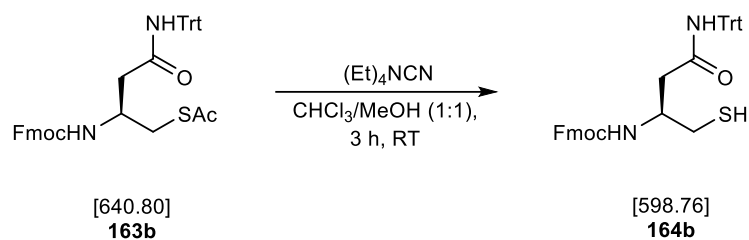
Das Fmoc-Aminoiodid **162b** wurde in DMF gelöst und mit Kaliumthioacetat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 70 °C rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde abkondensiert und der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit einer halb gesättigten NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/EtOAc; 5:2) aufgereinigt. Die Titelverbindung **163b** wurde als oranger Feststoff (0.57 mmol, 57%) erhalten.

DC: $R_f = 0.24$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 2:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 8.56$ (s, 1H, NHTrt), 7.89 (d, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Fmoc), 7.69 (d, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Fmoc), 7.46-7.25 (m, 4H, Fmoc), 7.25-7.09 (m, 15H, Trt), 4.48-4.12 (m, 3H, Fmoc), 3.93 (m, 1H, H_α), 3.06 (dd, 1H, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 5.2$ Hz, H_{β^t}), 2.82 (dd, 1H, $^2J = 13.6$ Hz, $^3J = 7.4$ Hz, H_{β^h}), 2.51 (dd, 1H, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 9.0$ Hz, H_{β^t}), 2.39 (dd, 1H, $^2J = 14.1$ Hz, $^3J = 5.8$ Hz, H_{β^h}), 2.31 (s, 3H, SAc) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{40}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 663.2288, gef.: 663.2286.



6.3.6.4 Darstellung von *N*-Fmoc-Asparaginthiol (ASSL014)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [mg]	V [mL]
Fmoc-Aminothioacetat	640.80	0.27	1.00	170	
Tetraethylammoniumcyanid	156.27	0.14	0.50	21.8	
Chloroform					3.50
Methanol					3.50

Durchführung:

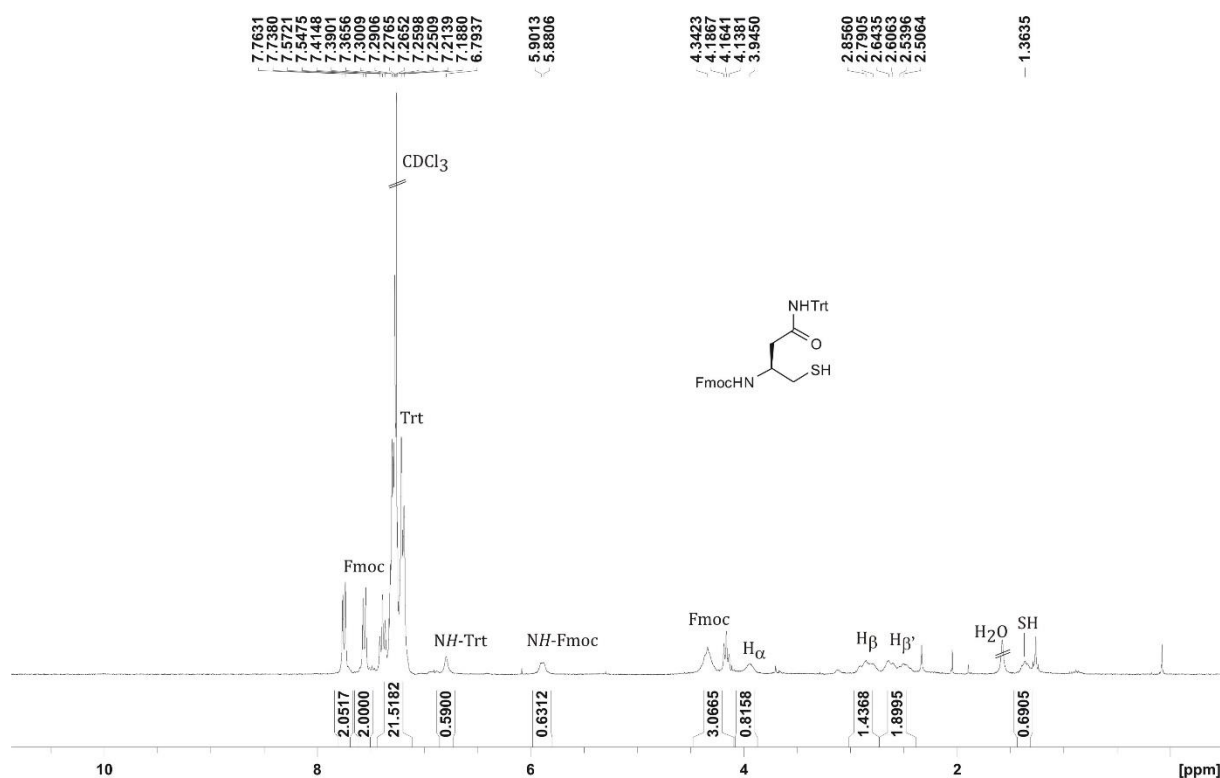
Die Spaltung des Thioacetates **163b** wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA11** durchgeführt. Die Titelverbindung **164b** wurde als farbloser Feststoff (0.24 mmol, 89%) erhalten.

DC: $R_f = 0.73$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, CDCl_3 ; $\delta = 7.75$ (d, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.56 (d, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Fmoc), 7.44-7.35 (m, 2H, Fmoc), 7.35-7.12 (m, 17H, Fmoc, Trt), 6.79 (s, 1H, Trt-NH), 5.78-5.98 (m, 1H, Fmoc-NH), 4.45-4.12 (m, 3H, Fmoc), 3.85-4.03 (m, 1H, H_α), 3.19-2.38 (m, 4H, H_β , $H_{\beta'}$), 1.58 (s, 1H, SH) ppm.

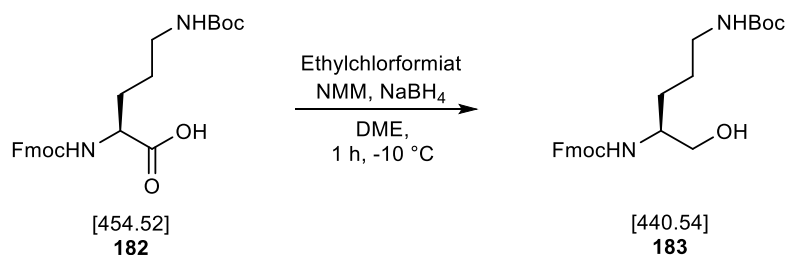
$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, CDCl_3 ; $\delta = 128.5$ (Trt), 128.1 (Trt), 127.6 (Fmoc), 127.1 (Fmoc), 125.0 (Fmoc), 119.9 (Fmoc), 66.7 (Fmoc- CH_2), 51.0 (C_α), 47.0 (Fmoc-CH), 38.3 (C_β), 27.7 ($C_{\beta'}$) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{38}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 621.2182, gef.: 621.2176.



6.3.7 Darstellung von *N*-Fmoc-Citrullinthiol (Fmoc-Cis-SH)

6.3.7.1 Darstellung von *N*-Fmoc-Ornithinol (PFV08)



Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Fmoc-Orn(Boc)-OH	454.52	10.0	1.00	4.59	
<i>N</i> -Methylmorpholin	101.15	10.0	1.00	1.01	1.10
Chlorameisensäureethylester	108.52	10.0	1.00	1.09	0.95
Natriumborhydrid	37.83	15.0	1.50	0.57	
Dimethoxyethan					50.0
Wasser (dest.)					125

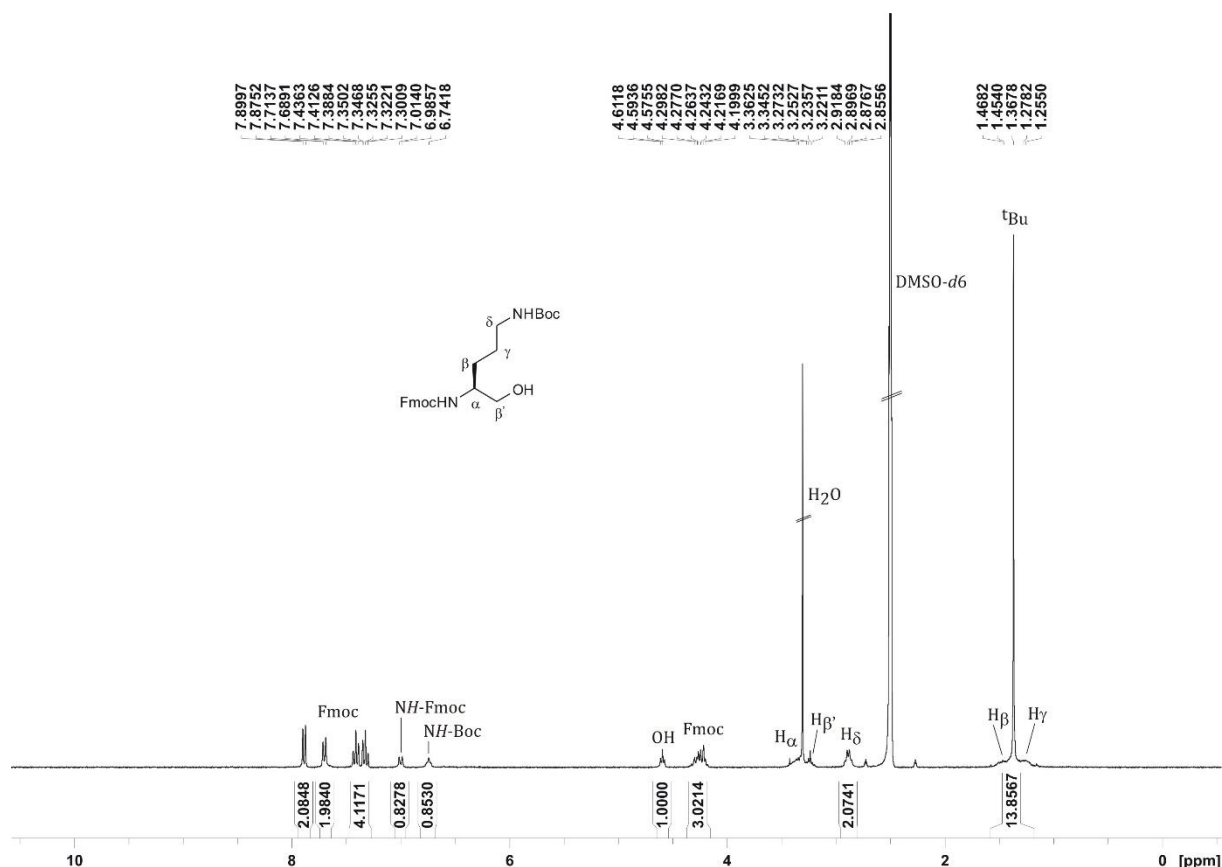
Durchführung:

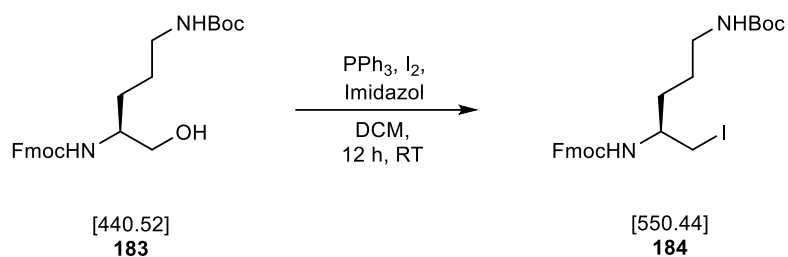
Die Reduktion der Fmoc-geschützten Aminosäure **182** wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA9** durchgeführt. Die Titelverbindung **183** wurde als farbloser Feststoff erhalten (7.97 mmol, 80%).

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 7.88 (d, 2H, 3J = 7.4 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 1H, 3J = 7.4 Hz, Fmoc), 7.41 (t, 2H, 3J = 7.4 Hz, Fmoc) 7.32 (t, 2H, 3J = 7.4 Hz, Fmoc), 7.00 (d, 1H, 3J = 8.5 Hz, Fmoc-NH), 6.74 (t, 1H, 3J = 5.6 Hz, Boc-NH), 4.59 (t, 1H, 3J = 5.6 Hz, OH), 4.36-4.15 (m, 3H, Fmoc), 3.45-3.18 (m, 3H, H_α , $H_{\beta'}$), 2.89 (m, 2H, H_δ), 1.56-1.41 (m, 2H, H_β), 1.36 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.34-1.18 (m, 2H, H_γ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 127.2 (Fmoc), 126.8 (Fmoc), 125.3 (Fmoc), 120.0 (Fmoc), 65.0 (Fmoc- CH_2), 63.3 ($\text{C}_{\beta'}$), 52.5 (C_α), 46.6 (Fmoc-CH), 39.8 (C_δ), 28.1 (C_β), 28.0 ($(\text{CH}_3)_3$), 26.2 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{25}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 463.2204, gef.: 463.2203.



6.3.7.2 Darstellung von *N*-Fmoc-Ornithiniodid (PFV09)

Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
FmocOrn(Boc)CH ₂ OH	440.54	7.94	1.00	3.50	
Triphenylphosphin	262.28	23.8	3.00	6.24	
Iod	253.81	23.8	3.00	6.04	
Imidazol	68.08	39.7	5.00	2.70	
DCM _{abs.}					200

Durchführung:

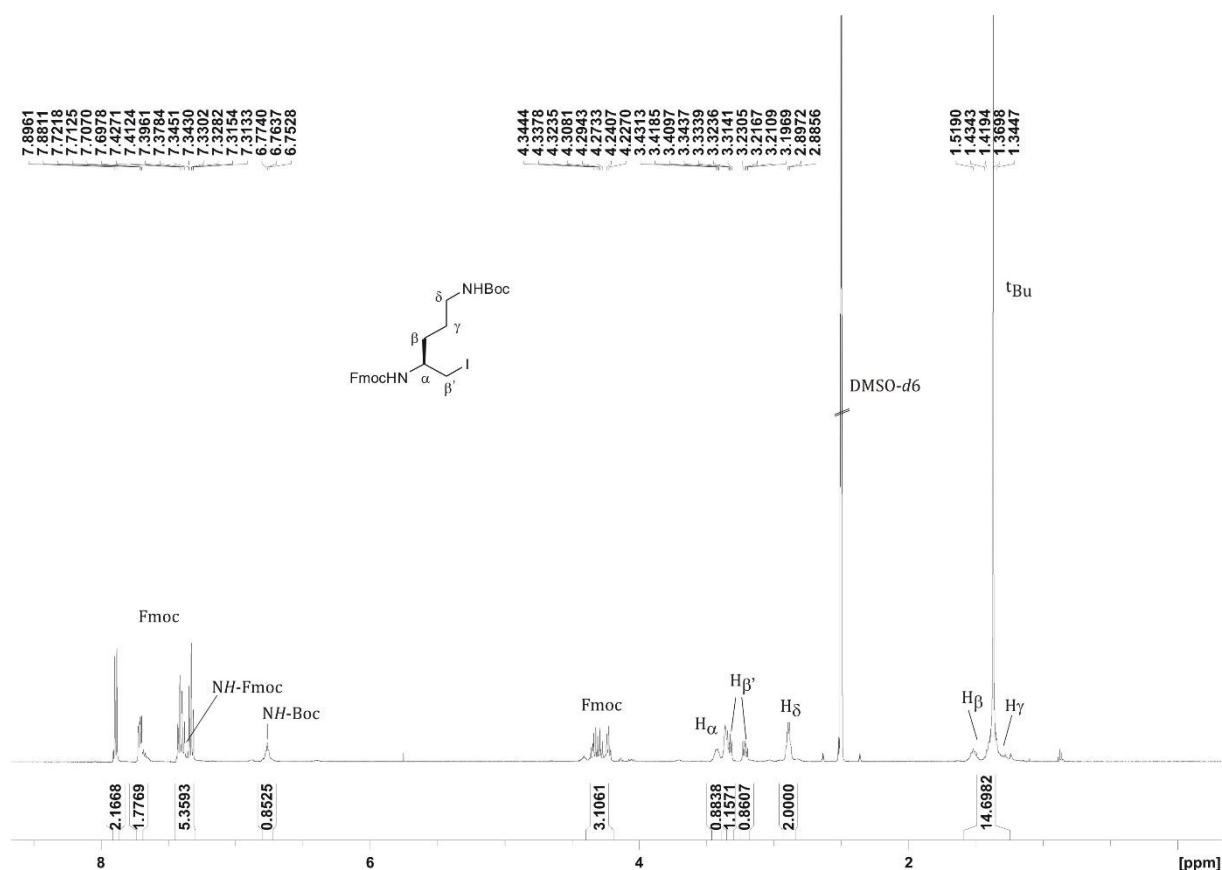
Die Einführung des Iods wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA10** durchgeführt. Die Titelverbindung **184** wurde als Farbloser Feststoff (7.25 mmol, 91%) erhalten.

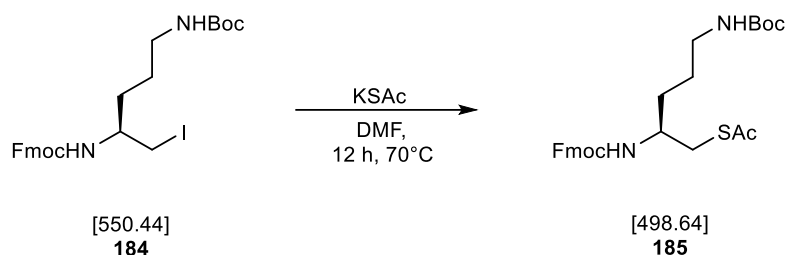
DC: $R_f = 0.10$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 3:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.88$ (d, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.71 (d, 1H, $^3J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, $^3J = 7.5$ Hz, Fmoc), 7.44-7.30 (m, 4H, Fmoc), 7.36 (m, 1H, Fmoc-NH), 6.76 (t, 1H, $^3J = 5.5$ Hz, Boc-NH), 4.38-4.27 (m, 2H, Fmoc- CH_2), 4.26-4.20 (m, 1H, Fmoc-9H), 3.42 (m, 1H, H_α), 3.32 (dd, 1H, $^2J = 9.9$ Hz, $^3J = 4.8$ Hz, $H_{\beta'}^t$), 3.21 (dd, 1H, $^2J = 9.9$ Hz, $^3J = 6.9$ Hz, $H_{\beta'}^h$), 2.89, (m, 2H, H_δ), 1.52 (m, 1H, H_{β}^h), 1.43-1.30 (m, 2H, H_γ), 1.37 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$), 1.36 (m, 1H, H_{β}^t) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 127.2$ (Fmoc), 126.7 (Fmoc), 124.8 (Fmoc), 119.7 (Fmoc), 65.1 (Fmoc- CH_2), 51.3 (C_α), 46.4 (Fmoc-CH), 39.1 (C_δ), 30.7 (C_β), 27.9 $(\text{CH}_3)_3$, 25.8 (C_γ), 12.9 ($C_{\beta'}$) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{25}\text{H}_{31}\text{IN}_2\text{O}_4]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 573.1221, gef.: 573.1223.



6.3.7.3 Darstellung von *N*-Fmoc-Ornithinthioacetat (PFV10)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Fmoc-Orn(Boc)-CH ₂ I	550.44	3.63	1.00	2.00	
Kaliumthioacetat	114.21	4.00	1.10	0.46	
DMF					50.0

Durchführung:

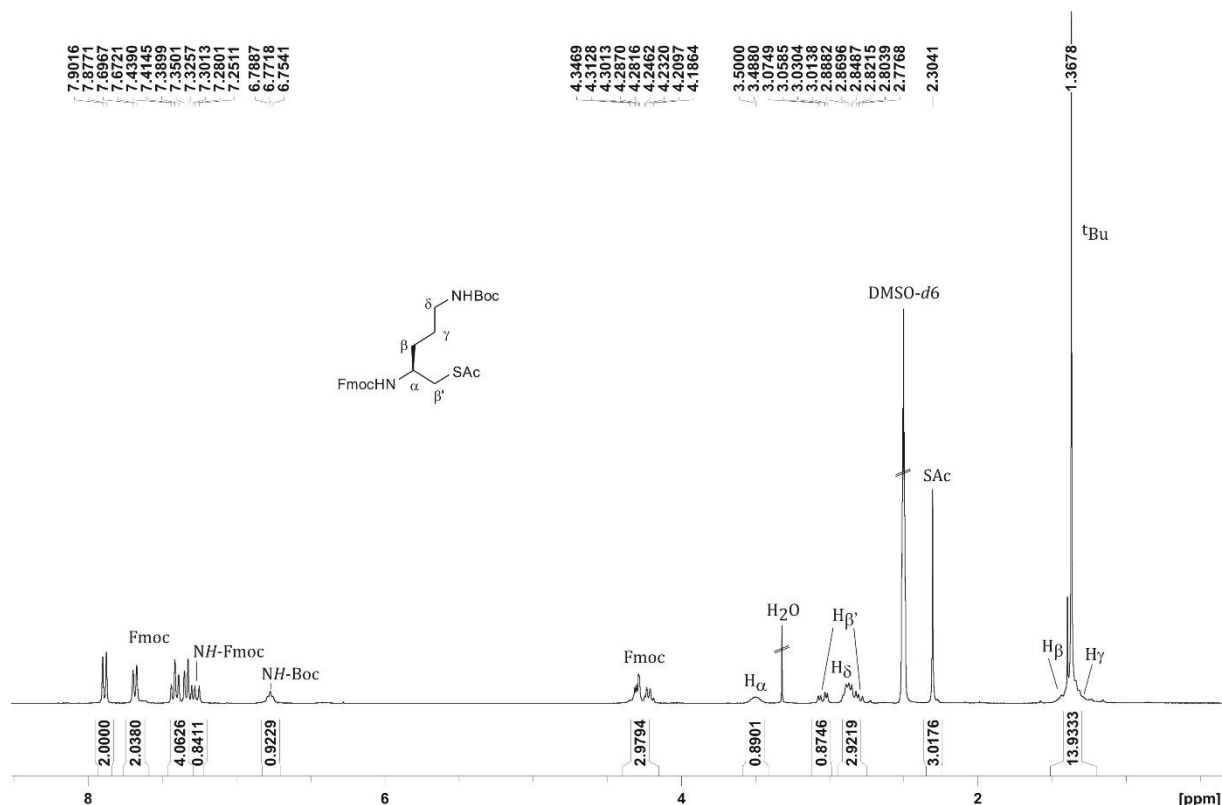
Das Fmoc-Aminoiodid **184** wurde in DMF gelöst und mit Kaliumthioacetat versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht bei 70 °C rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde abkondensiert und der Rückstand in EtOAc aufgenommen und mit einer halb gesättigten NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/EtOAc; 3:1) aufgereinigt. Die Titelverbindung **185** wurde als oranger Feststoff (2.43 mmol, 67%) erhalten.

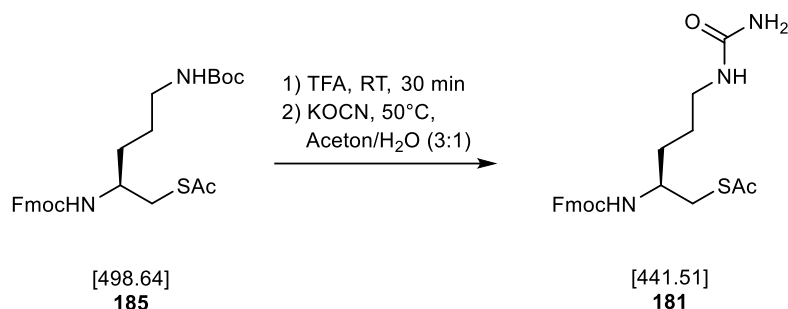
DC: $R_f = 0.12$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 5:2)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.88$ (d, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Fmoc), 7.68 (d, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Fmoc), 7.41 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Fmoc), 7.32 (t, 2H, $^3J = 7.4$ Hz, Fmoc), 7.26 (d, 1H, $^3J = 8.7$ Hz, Fmoc-NH), 6.77 (t, 1H, $^3J = 5.3$ Hz, Boc-NH), 4.37-4.16 (m, 3H, Fmoc), 3.49 (m, 1H, H_α), 3.04 (dd, 1H, $^2J = 13.4$ Hz, $^3J = 5.0$ Hz, $H_{\beta'}$), 2.88 (m, 2H, H_δ), 2.81 (dd, 1H, $^2J = 13.4$ Hz, $^3J = 8.1$ Hz, $H_{\beta'}$), 2.30 (s, 3H, SAc), 1.43-1.32 (m, 2H, H_β), 1.41-1.28 (m, 2H, H_γ), 1.36 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 127.4$ (Fmoc), 126.9 (Fmoc), 125.1 (Fmoc), 119.2 (Fmoc), 65.1 (Fmoc- CH_2), 50.1 (C_α), 46.6 (Fmoc-CH), 39.3 (C_δ), 33.4 ($C_{\beta'}$), 30.8 (C_β), 30.4 (SCOCH₃), 28.1 $(\text{CH}_3)_3$, 26.1 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{27}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}]^+$ (M+Na); ber.: 521.2081, gef.: 521.2081.



6.3.7.4 Darstellung von *N*-Fmoc-Citrullinthioacetat (SLD370/PFV15)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Fmoc-Orn(Boc)-CH ₂ SAc	498.64	4.00	1.00	2.00	
TFA					40.0
Kaliumthioisocyanat	81.12	10.0	2.50	0.81	
Aceton					90.0
Wasser					30.0

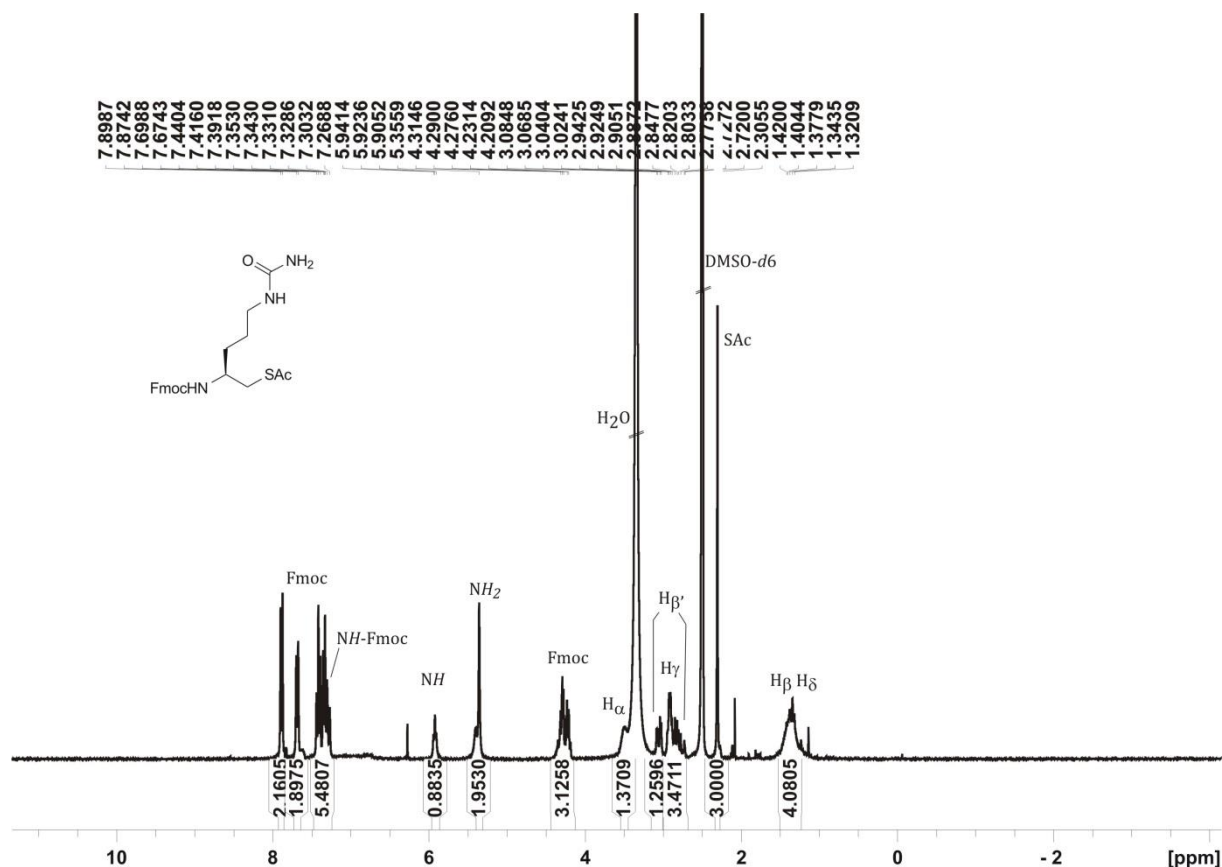
Durchführung:

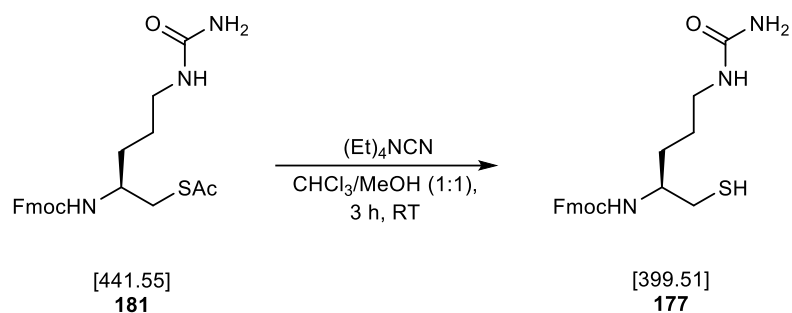
Das geschützte Aminothiol **185** (2.00 g, 4.00 mmol, 1.00 eq) wurde in TFA gelöst und für 1 h bei RT rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde abkondensiert und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Das Rohprodukt wurde ohne weiter Aufreinigung in einem 3:1 gemisch aus Aceton und Wasser gelöst und mit KOCN (0.81 g, 10.0 mmol, 2.50 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 8.5 h bei 50 °C rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde abkondensiert und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Die Titelverbindung **181** wurde quantitativ als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 7.88 (d, 2H, 3J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.68 (d, 2H, 3J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.41 (t, 2H, 3J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.33 (t, 2H, 3J = 7.5 Hz, Fmoc), 7.28 (d, 1H, 3J = 8.7 Hz, Fmoc-NH), 5.94 (t, 1H, 3J = 5.7 Hz, γ -NH), 5.41 (s, 2H, NH_2), 4.37-4.28 (m, 2H, Fmoc- CH_2), 4.24-4.18 (m, 1H, Fmoc-CH), 3.50 (m, 1H, H_α), 3.05 (dd, 1H, 2J = 13.5 Hz, 3J = 5.3 Hz, H_β^t), 2.91 (m, 2H, H_δ), 2.82 (dd, 1H, 2J = 13.5 Hz, 3J = 8.1 Hz, H_β^h), 2.30 (s, 3H, SAc), 1.48-1.31 (m, 2H, H_β), 1.40-1.25 (m, 2H, H_γ) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 127.5 (Fmoc), 127.0 (Fmoc), 125.0 (Fmoc), 119.9 (Fmoc), 65.1 (Fmoc- CH_2), 50.2 (C_α), 46.6 (Fmoc-CH), 38.8 (C_δ), 33.4 (C_β^t), 31.0 (C_β), 30.5 (SCOCH₃), 26.7 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}]^+$ (M+K); ber.: 480.1354, gef.: 480.1353.



6.3.7.5 Darstellung von *N*-Fmoc-Citrullinthiol (SLD442/PFV06)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Fmoc-Cit-CH ₂ SAc	441.55	4.53	1.00	2.00	
Tetraethylammoniumcyanid	156.27	4.53	1.00	0.71	
Chloroform					40.0
Methanol					40.0

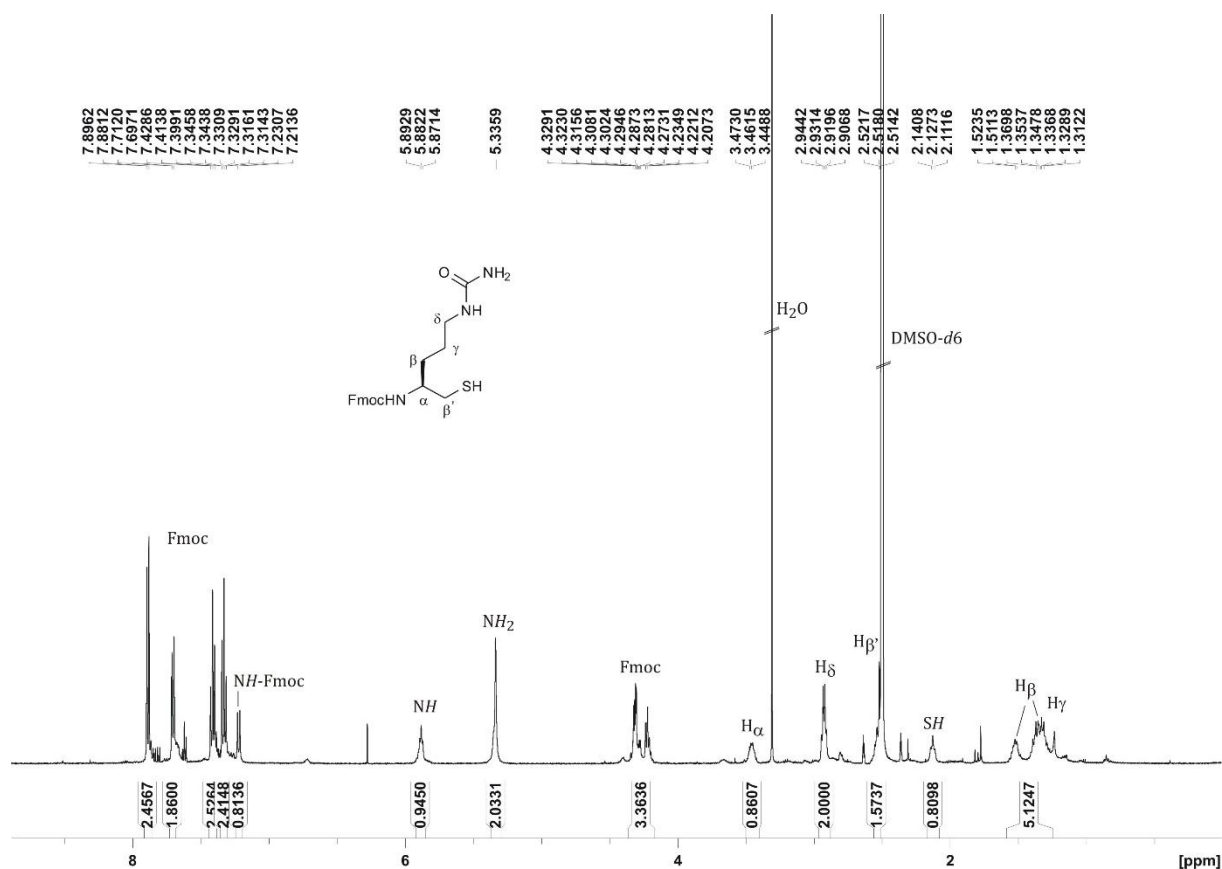
Durchführung:

Die Spaltung des Thioacetates **181** wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA11** durchgeführt. Die Titelverbindung **177** wurde als farbloser Feststoff (2.50 mmol, 55%) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 7.88 (d, 2H, 3J = 7.4 Hz, Fmoc), 7.70 (d, 2H, 3J = 7.4 Hz, Fmoc), 7.41 (t, 2H, 3J = 7.4 Hz, Fmoc), 7.33 (t, 2H, 3J = 7.4 Hz, Fmoc), 7.22 (d, 1H, 3J = 8.5 Hz, Fmoc-NH), 5.88 (t, 1H, 3J = 5.7 Hz, γ -NH), 5.33 (s, 2H, NH_2), 4.36-4.26 (m, 2H, Fmoc- CH_2), 4.26-4.18 (m, 1H, Fmoc-CH), 3.45 (m, 1H, H_α), 2.92 (m, 2H, H_δ), 2.58-2.47 (m, 2H, $H_{\beta'}$), 2.12 (t, 1H, 3J = 7.8 Hz, SH), 1.51-1.31 (m, 1H, H_{β^t}), 1.43-1.25 (m, 2H, H_γ), 1.34 (m, 1H, H_{β^h}) ppm.

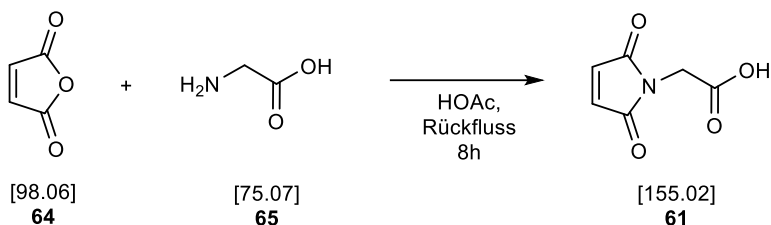
$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 127.9 (Fmoc), 127.4 (Fmoc), 125.6 (Fmoc), 120.4 (Fmoc), 65.5 (Fmoc- CH_2), 53.4 (C_α), 47.2 (Fmoc-CH), 39.4 (C_δ), 29.1 ($C_{\beta'}$), 30.7 (C_β), 27.1 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}]^+$ ($\text{M}+\text{H}$); ber.: 400.1689, gef.: 400.1692.



6.4 Darstellung der Maleimid-Peptidbausteine

6.4.1 Darstellung von Mal=Gly (SLD051)



Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Maleinsäureanhydrid	98.06	81.6	1.00	8.00	
Glycin	75.07	89.7	1.10	6.72	
Essigsäure					200

Durchführung:

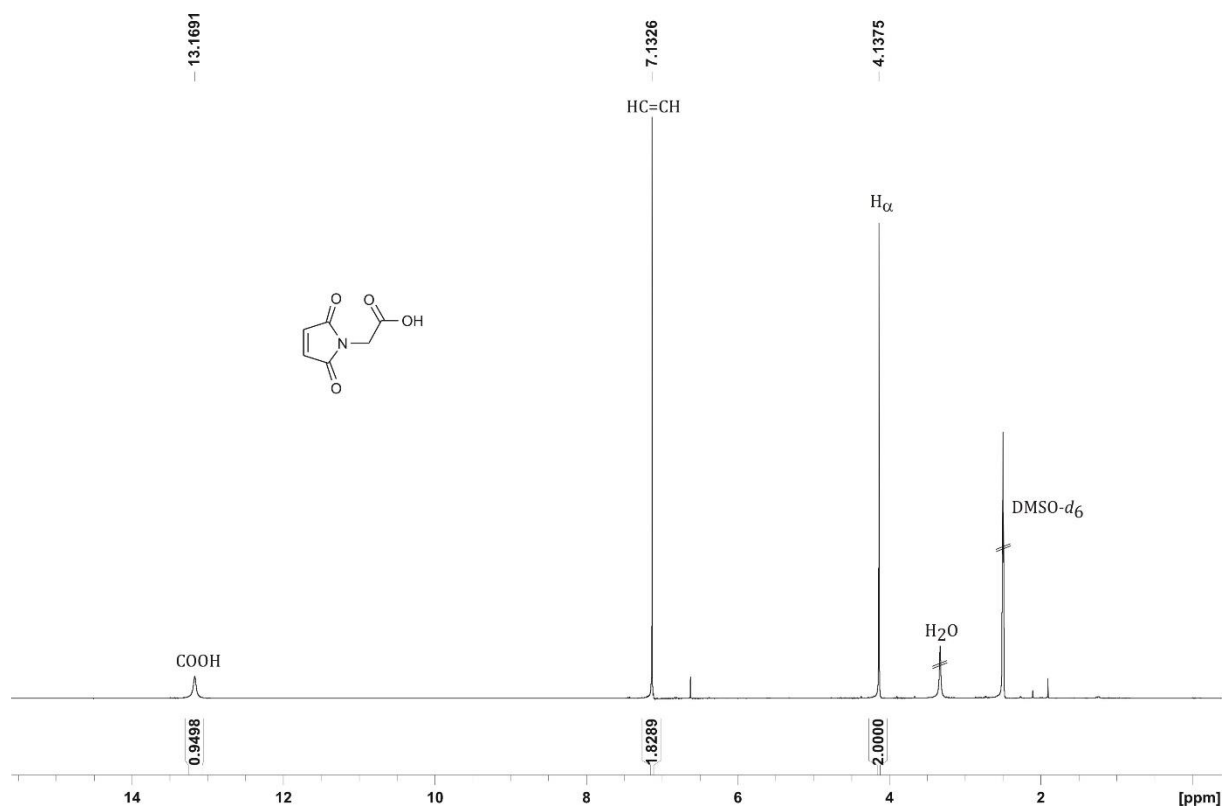
Maleinsäureanhydrid (81.6 mmol, 1.00 eq) und Glycin (89.7 mmol, 1.10 eq) wurden in 200 mL Essigsäure gelöst und für 14 h bei RT rühren gelassen. Anschließend wurde für 8 h unter Rückfluss rühren gelassen und nach Abkühlen auf RT für weitere 14 h rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Der Rückstand wurde säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigt (DCM/HOAc/MeOH, 95:4:1). Die Produktfraktionen wurden vereinigt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde über Nacht am Feinvakuum getrocknet. Es wurden 6.15 g (39.7 mmol, 51%) der Titelverbindung **61** als farbloses Pulver erhalten.

DC: $R_f = 0.25$ (DCM/Essigsäure 95:5)

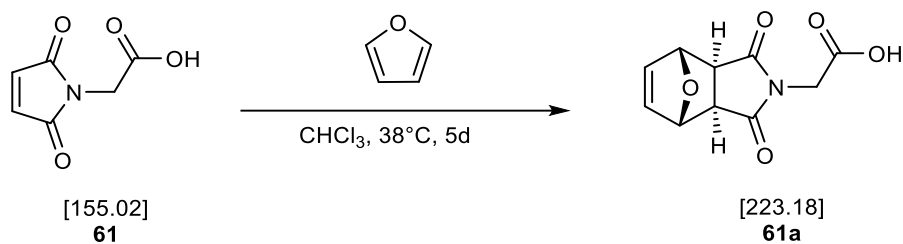
$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.13$ (s, 2H, =CH-), 4.14 (s, 2H, H_α) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 170.4$ (N-C=O), 168.9 (COOH), 134.9 (=CH), 38.5 (C_α) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_4\text{N}]^-$ (M-H); ber.: 154.0146, gef.: 154.0147.



6.4.2 Darstellung von PG-Mal=Gly (SLD153)



Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
N-Carboxymethylmaleimid	155.02	3.87	1.00	0.60	
Furan	68.07	7.74	2.00	0.53	0.57
Chloroform					8.00

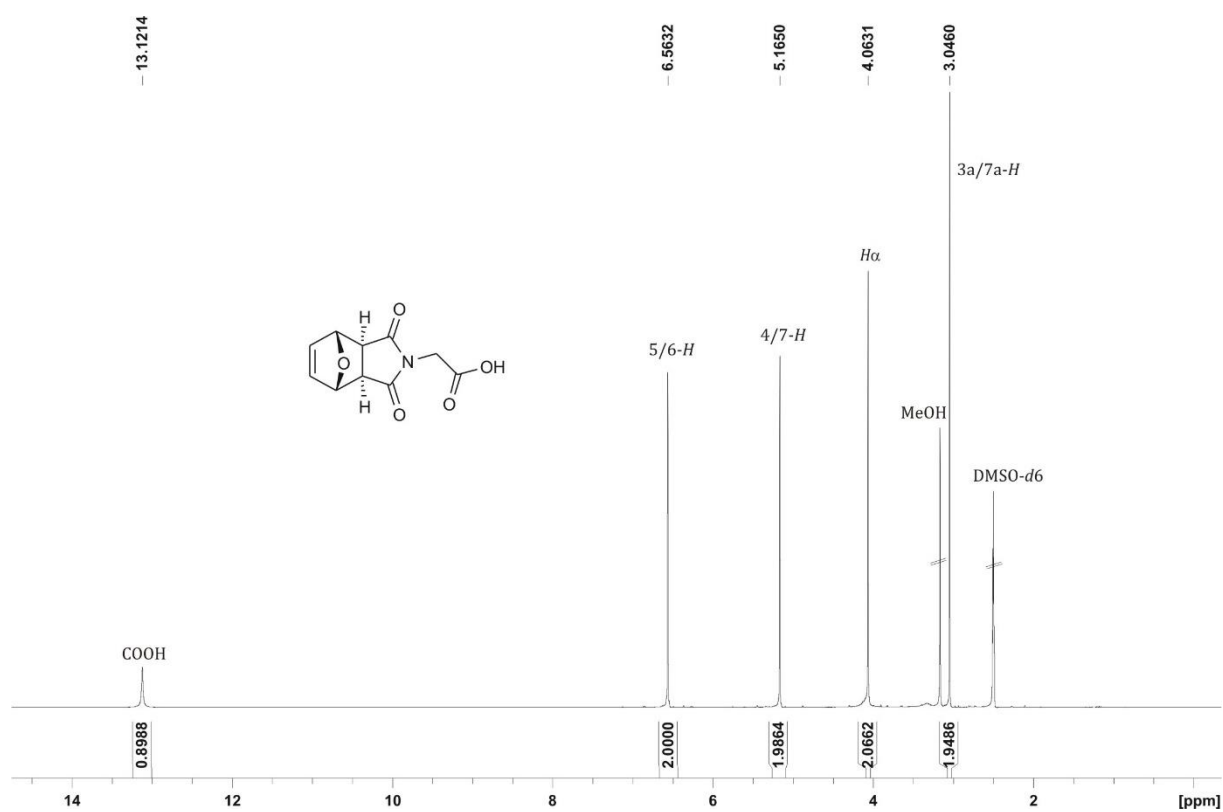
Durchführung:

N-Carboxymethylmaleimid (3.87 mmol, 1.00 eq) wurden in 8 mL Chloroform gelöst und mit Furan (7.74 mmol, 2.00 eq) versetzt. Das Gemisch wurde für 5 d bei 38 °C rühren gelassen. Anschließend wurde das Lösungsmittel am HV entfernt und der Rückstand in DCM aufgenommen, mit wenigen Tropfen Methanol versetzt und mit Pentan überschichtet. Die Lösung wurde 24 h bei 4 °C stehen gelassen. Das Lösungsmittel wurde abdekantiert und die farblosen Kristalle am HV getrocknet. Es wurden 600 mg (2.69 mmol, 70%) der diastereomerenreinen Titelverbindung **61a** erhalten.

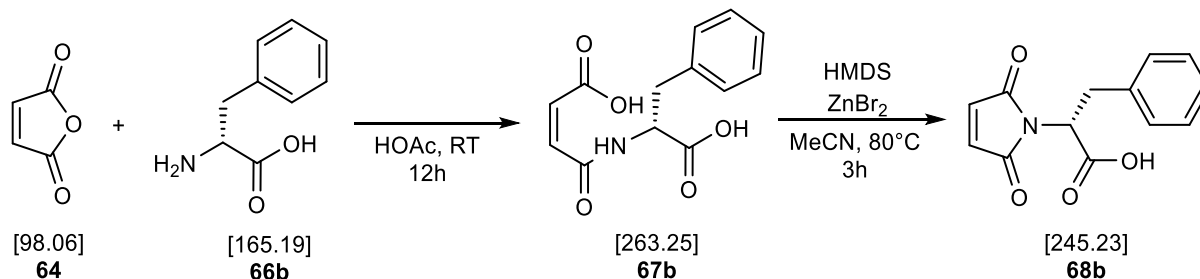
$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 13.13 (bs, 1H, COOH), 6.56 (t, 2H, 3J = 0.9 Hz, 5/6-*H*), 5.16 (t, 3J = 0.9 Hz, 2H, 4/7-*H*), 4.06 (s, H_α), 3.05 (s, 2H, 3a/7a-*H*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 175.6 (N-C=O), 167.9 (COOH), 136.5 (5/6-*C*), 80.3 (4/7-*C*), 47.2 (3a/7a-*C*), 39.4 (C_α) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{10}\text{H}_9\text{O}_5\text{N}]^-$ (M-H); ber.: 222.0408, gef.: 222.0409.



6.4.3 Darstellung von Mal=phe (SLD166-2)



Ansatz:

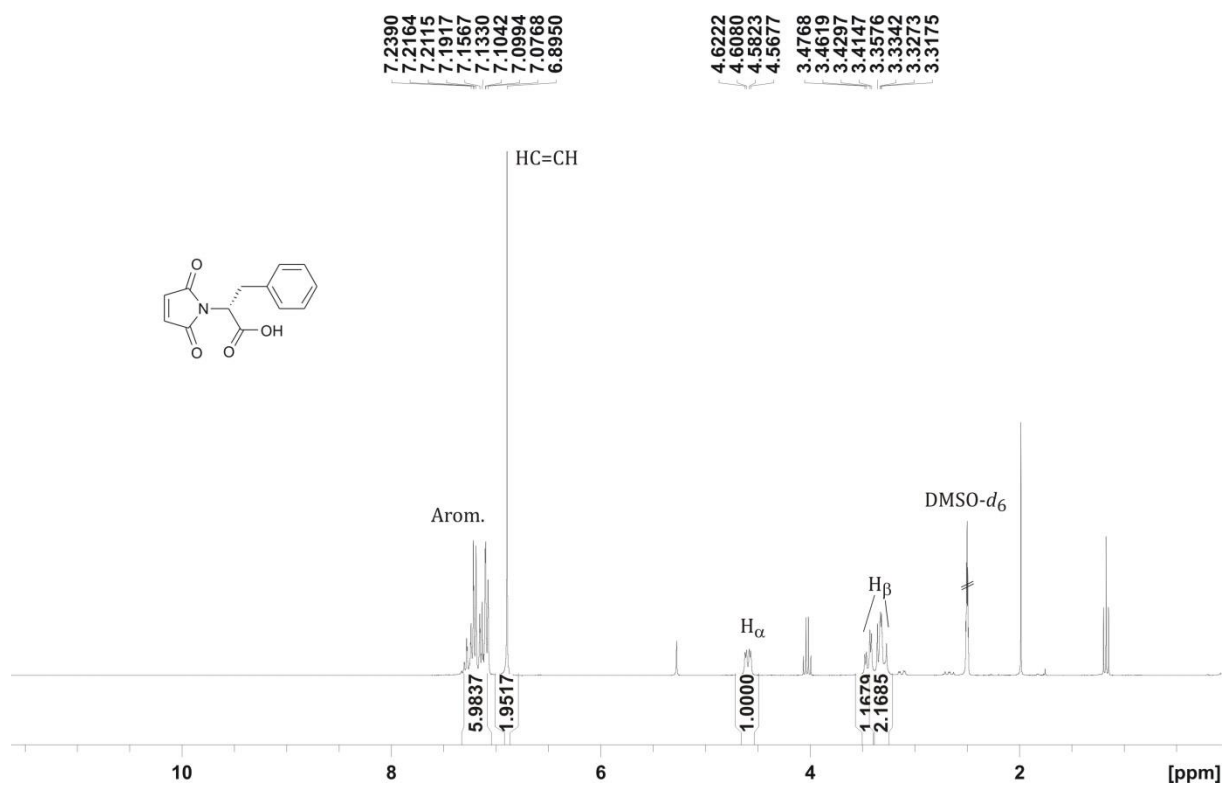
Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Maleinsäureanhydrid	98.06	20.4	1.00	2.00	
D-Phenylalanin	165.19	20.4	1.00	3.37	
Essigsäure					35.0
Hexamethyldisilazan	161.39	101	5.00	16.5	21.0
Zinkbromid	225.18	20.4	1.00	4.58	
Acetonitril					140

Durchführung:

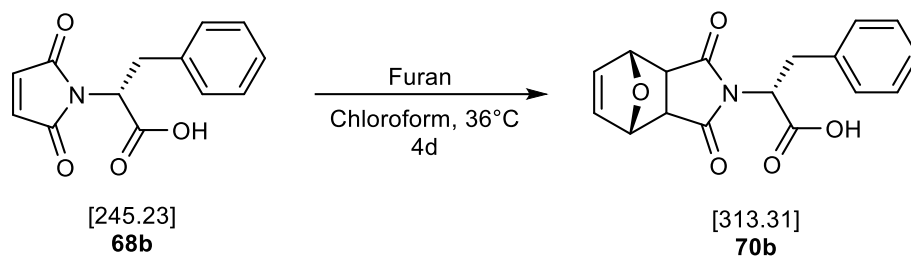
Maleinsäureanhydrid (2.00 g, 20.4 mmol, 1.00 eq) und D-Phenylalanin (3.37 g, 20.4 mmol, 1.00 eq) wurden in 40.0 mL Essigsäure gelöst und bei RT gerührt, bis ein farbloser Niederschlag ausfiel. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Das farblose Maloyl-D-phenylalanin wurde in 140 mL Acetonitril gelöst und mit Zinkbromid versetzt. HMDS (21.0 mL, 101 mmol, 5.00 eq) wurde langsam zugegeben und das Gemisch für 3 h bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 50.0 mL Essigsäureethylester aufgenommen und mit 30.0 mL einer 0.5 M HCl-Lösung versetzt. Es wurde viermal mit je 60 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde am Feinvakuum getrocknet. Es wurden 3.80 g (15.5 mmol, 76%) der Titelverbindung **68b** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 7.33-7.04 (m, 5H, Arom.), 6.89 (s, 2H, =CH-), 4.59 (dd, 1H, 3J = 12.2 Hz, 3J = 4.5 Hz, H_α), 3.44 (dd, 1H, 2J = 14.2 Hz, 3J = 4.5 Hz, H_β^t), 3.31 (dd, 1H, 2J = 14.2 Hz, 3J = 12.2 Hz, H_β^h) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}]^+$ (M+H); ber.: 268.0580, gef.: 268.0581.



6.4.4 Darstellung von PG-Mal=phe (SLD166-3)



Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Mal=phe	245.23	15.5	1.00	3.80	
Furan	68.08	46.5	3.00	3.16	3.40
Chloroform					50.0

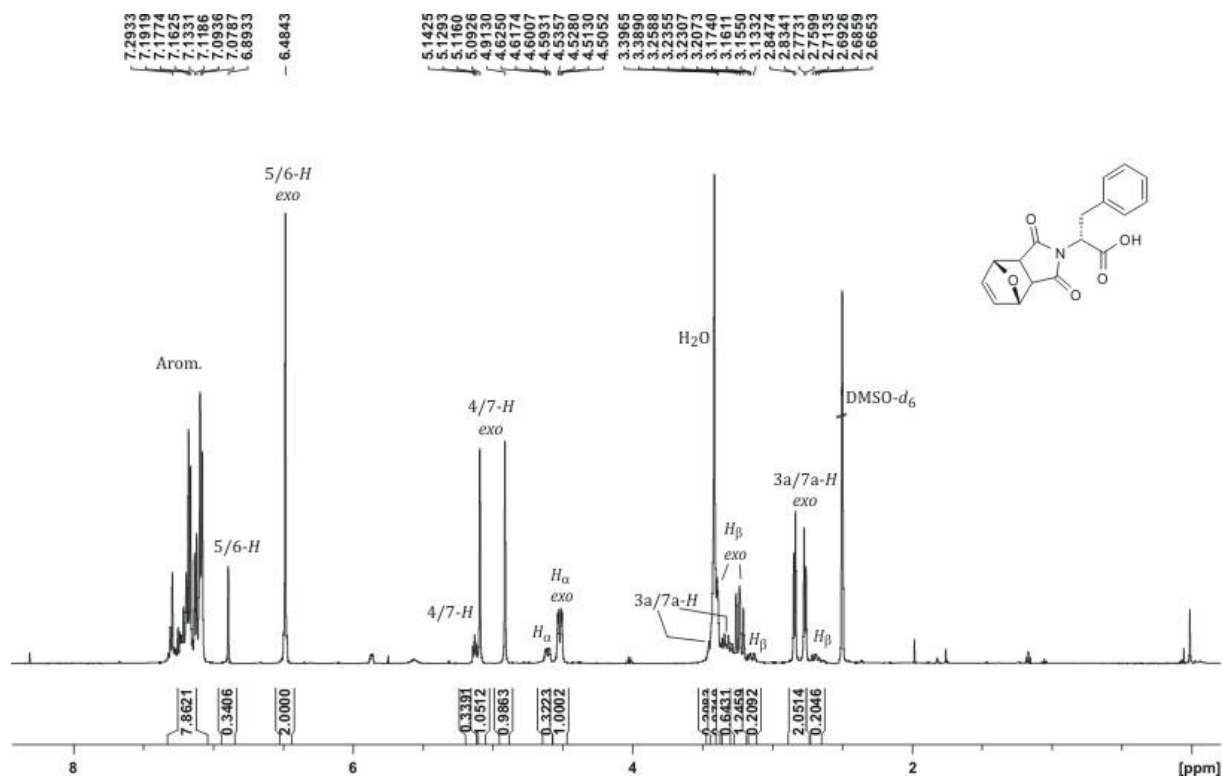
Durchführung:

Es wurden 3.80 g des Mal=phe (15.5 mmol, 1.00 eq) in 50.0 mL Chloroform gelöst und mit frisch destilliertem Furan (46.5 mmol, 3.00 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 Tage bei 36°C rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Es wurden 4.86 g der Titelverbindung (15.5 mmol, quant.) als kristallin gelber Feststoff erhalten.

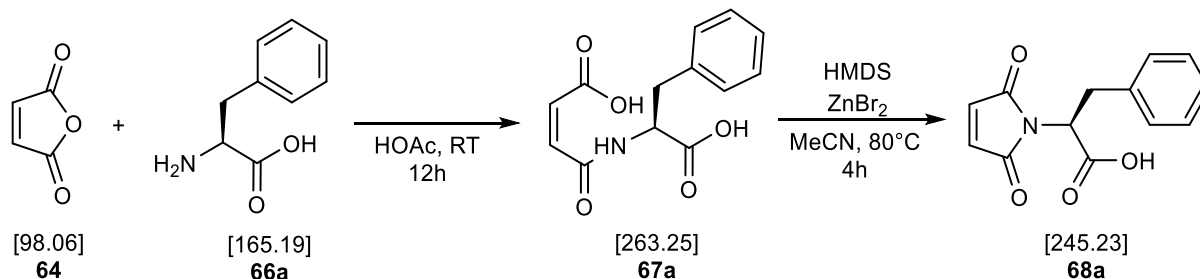
$^1\text{H-NMR}$: 500 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 7.33-7.04 (m, 5H, Arom.), 6.48 (s, 2H, 5/6-*H*), 5.09 (s, 1H, 4/7-*H*), 4.91 (s, 1H, 4/7-*H*), 4.52 (dd, 1H, 3J = 11.4 Hz, 3J = 3.9 Hz, H_α), 3.40 (dd, 1H, 2J = 14.2 Hz, 3J = 3.9 Hz, H_β), 3.23 (dd, 1H, 2J = 14.2 Hz, 3J = 11.4 Hz, H_β), 2.84 (d, 1H, 3J = 6.6 Hz, 3a/7a-*H*), 2.76 (d, 1H, 3J = 6.6 Hz, 3a/7a-*H*) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 136.3 (5/6-*C*), 128.5, 127.8, 125.9 (Aromat), 80.0 (4/7-*C*), 55.5 (C_α), 46.6 (3a/7a-*C*), 33.8 (C_β) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{O}_5\text{N}]^+$ (M-Na); ber.: 336.0842, gef.: 336.0845.



6.4.5 Darstellung von Mal=Phe (TvK71)



Ansatz:

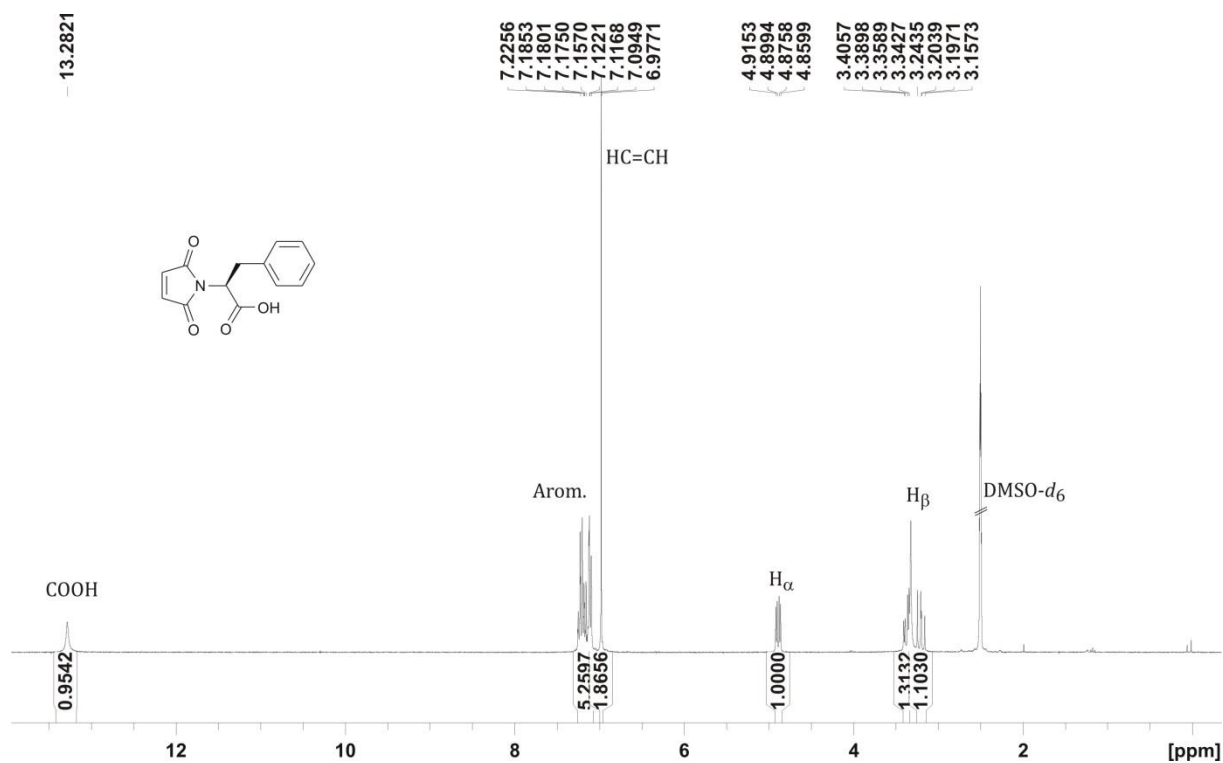
Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Maleinsäureanhydrid	98.06	20.4	1.00	2.00	
L-Phenylalanin	165.19	20.4	1.00	3.37	
Essigsäure					40.0
Hexamethyldisilazan	161.39	102	5.00	16.5	21.2
Zinkbromid	225.18	20.4	1.00	4.59	
Acetonitril					140

Durchführung:

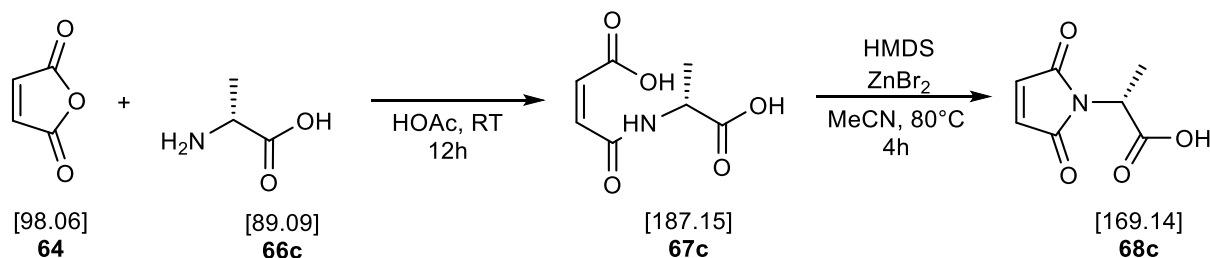
Maleinsäureanhydrid (2.00 g, 20.4 mmol, 1.00 eq) und L-Phenylalanin (3.37 g, 20.4 mmol, 1.00 eq) wurden in 40.0 mL Essigsäure gelöst und für 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde in einen Filtertiegel gegeben, mit wenig kaltem Diethylether gewaschen und am Feinvakuum getrocknet. Das farblose Maloyl-L-phenylalanin (5.30 g, 20.4 mmol, 1.00 eq) wurde in 140 mL Acetonitril gelöst und mit Zinkbromid versetzt. HMDS (21.2 mL, 16.5 g, 102 mmol, 5.00 eq) wurde langsam zugegeben und das Gemisch für 3 h bei 80 °C gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand in 50.0 mL Wasser aufgenommen. Die Suspension wurde mit einer 0.5 M HCl-Lösung angesäuert und viermal mit je 150 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde am Feinvakuum getrocknet. Es wurden 4.97 g (20.2 mmol, 99%) der Titelverbindung **68a** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 13.28 (bs, 1H, COOH), 7.30-7.05 (m, 5H, Arom.), 6.92 (s, 2H, =CH-), 4.70 (dd, 1H, 3J = 12.1 Hz, 3J = 4.7 Hz, H_α), 3.41 (dd, 1H, 2J = 14.1 Hz, 3J = 4.7 Hz, H_β^t), 3.26 (dd, 1H, 2J = 14.1 Hz, 3J = 12.1 Hz, H_β^h) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{O}_4\text{N}]^+$ (M+H); ber268.0580, gef.: 268.0581.



6.4.6 Darstellung von Mal=ala (SLD112-2)



Ansatz:

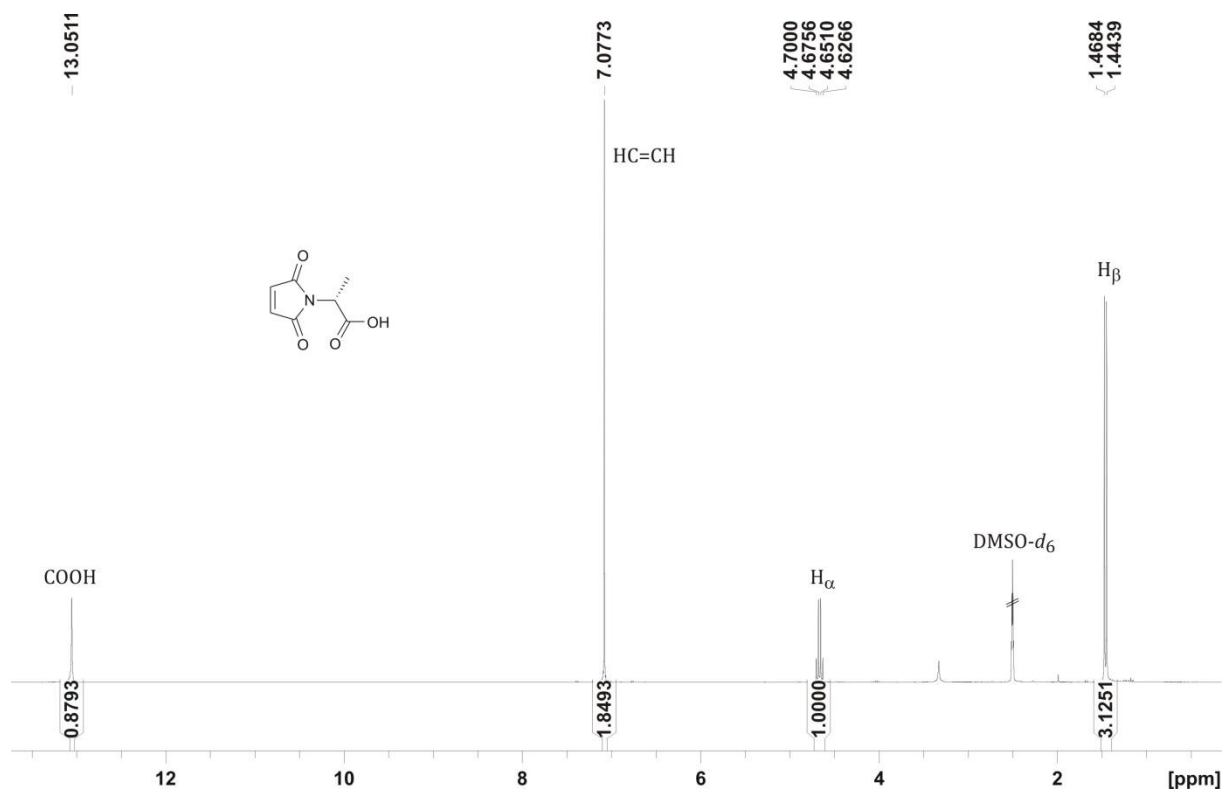
Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Maleinsäureanhydrid	98.06	7.48	1.10	0.73	
D-Alanin	89.09	6.80	1.00	0.60	
Essigsäure					16.0
Hexamethyldisilazan	161.39	34.0	5.00	5.48	7.00
Zinkbromid	225.18	6.80	1.00	1.53	
Acetonitril					35.0

Durchführung:

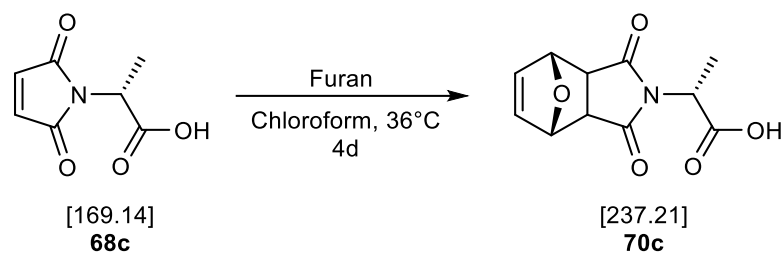
Maleinsäureanhydrid (7.48 mmol, 1.10 eq) und D-Alanin (6.80 mmol, 1.00 eq) wurden in 16.0 mL Essigsäure gelöst und für 18 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde mit wenig kaltem Diethylether gewaschen und am Feinvakuum getrocknet. Das farblose Maloyl-D-alanin (6.80 mmol, 1.00 eq) wurde in 35.0 mL Acetonitril gelöst und mit Zinkbromid versetzt. HMDS (7.00 mL, 34.0 mmol, 5.00 eq) wurde langsam zugetropft und das Gemisch anschließend für 4 h bei 80 °C gerührt. Nach abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde in 12.0 mL einer 0.5 M HCl-Lösung aufgenommen und viermal mit je 30 mL EtOAc extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit einer ges. Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde am Feinvakuum getrocknet. Es wurden 766 mg (4.53 mmol, 67%) der Titelverbindung **68c** als farbloser Feststoff erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 13.05 (bs, 1H, COOH), 7.07 (s, 2H, C=C), 4.66 (q, 1H, 3J = 7.4 Hz, H_α), 1.45 (d, 3H, 3J = 7.4 Hz, H_β) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_7\text{H}_7\text{O}_4\text{N}]^-$ (M-H); ber.: 168.0302, gef.: 168.0302.



6.4.7 Darstellung von PG-Mal=ala (SLD167-3)



Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Mal=ala	169.14	9.23	1.00	1.56	
Furan	68.08	61.2	6.63	4.16	4.43
Chloroform					50.0

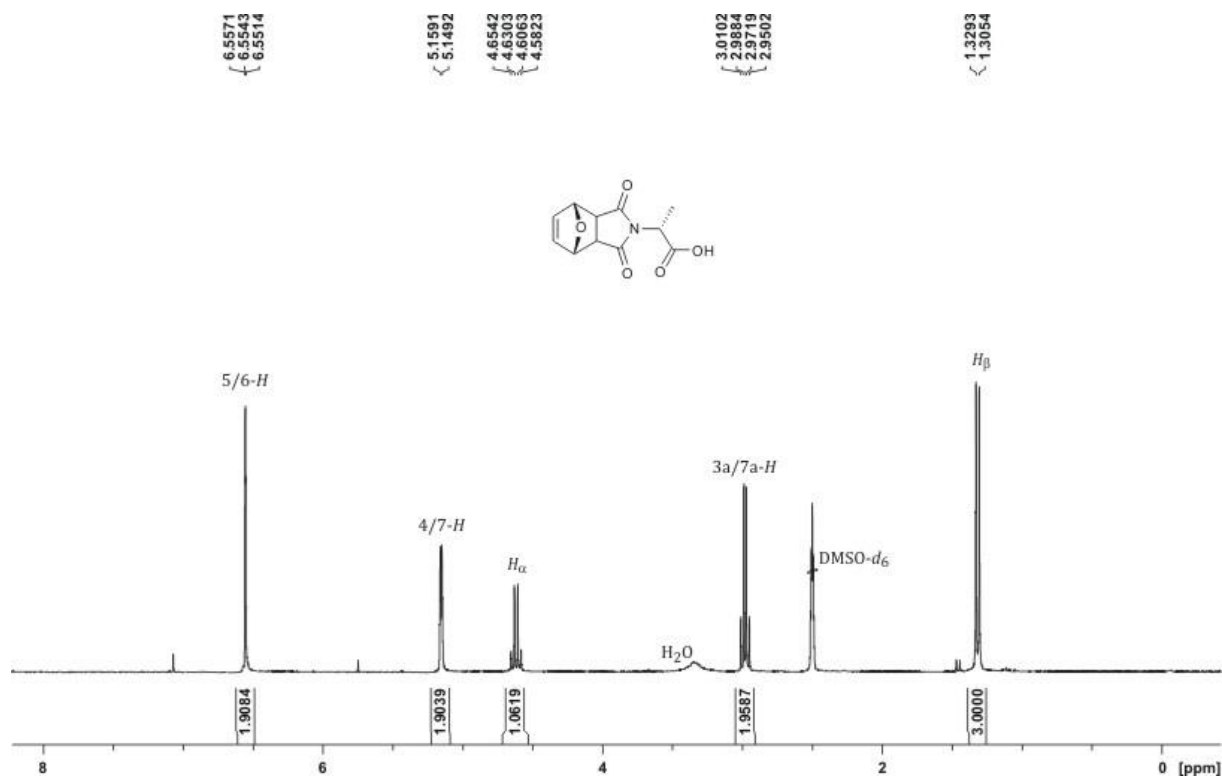
Durchführung:

Es wurden 1.56 g des Mal=ala (9.23 mmol, 1.00 eq) in 50.0 mL Chloroform gelöst und mit frisch destilliertem Furan (61.2 mmol, 6.63 eq) versetzt. Das Reaktionsgemisch wurde für 4 Tage bei 36 °C rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Es wurden 2.19 g der Titelverbindung **70c** (9.23 mmol, quant.) als gelber Feststoff erhalten.

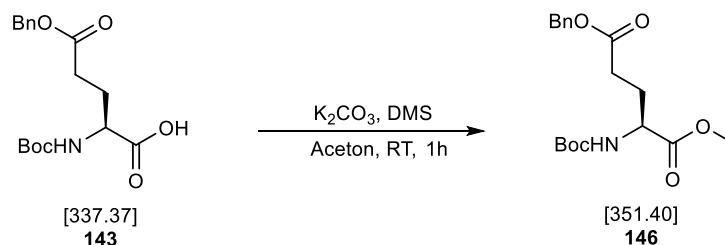
$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 6.55 (t, 2H, 3J = 0.8 Hz, 5/6-*H*), 5.15 (d, 3J = 0.8 Hz, 1H, 4/7-*H*), 5.14 (d, 3J = 0.8 Hz, 1H, 4/7-*H*), 4.06 (q, 1H, 3J = 7.3 Hz, H_α), 2.99 (d, 1H, 3J = 6.6 Hz, 3a/7a-*H*), 2.96 (d, 1H, 3J = 6.6 Hz, 3a/7a-*H*), 1.32 (d, 3H, 3J = 7.3 Hz, CH_3) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 136.4 (5/6-*C*), 80.3 (4/7-*C*), 46.9 (C_α), 46.7 (3a/7a-*C*), 13.9 (C_β) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_5\text{N}]^+$ (M-Na); ber.: 260.0529, gef.: 260.0531.



6.4.8 Darstellung von Mal=Glu(OTES)-OH

6.4.8.1 Darstellung von *N*-Boc-Glu(OBn)-OMe (ASSL029)

Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Boc-Glu(OBn)-OH	337.37	14.8	1.00	5.00	
Kaliumcarbonat	138.20	29.6	2.00	4.10	
Dimethylsulfat	126.13	16.3	1.10	2.06	1.55
Aceton					25.0

Durchführung:

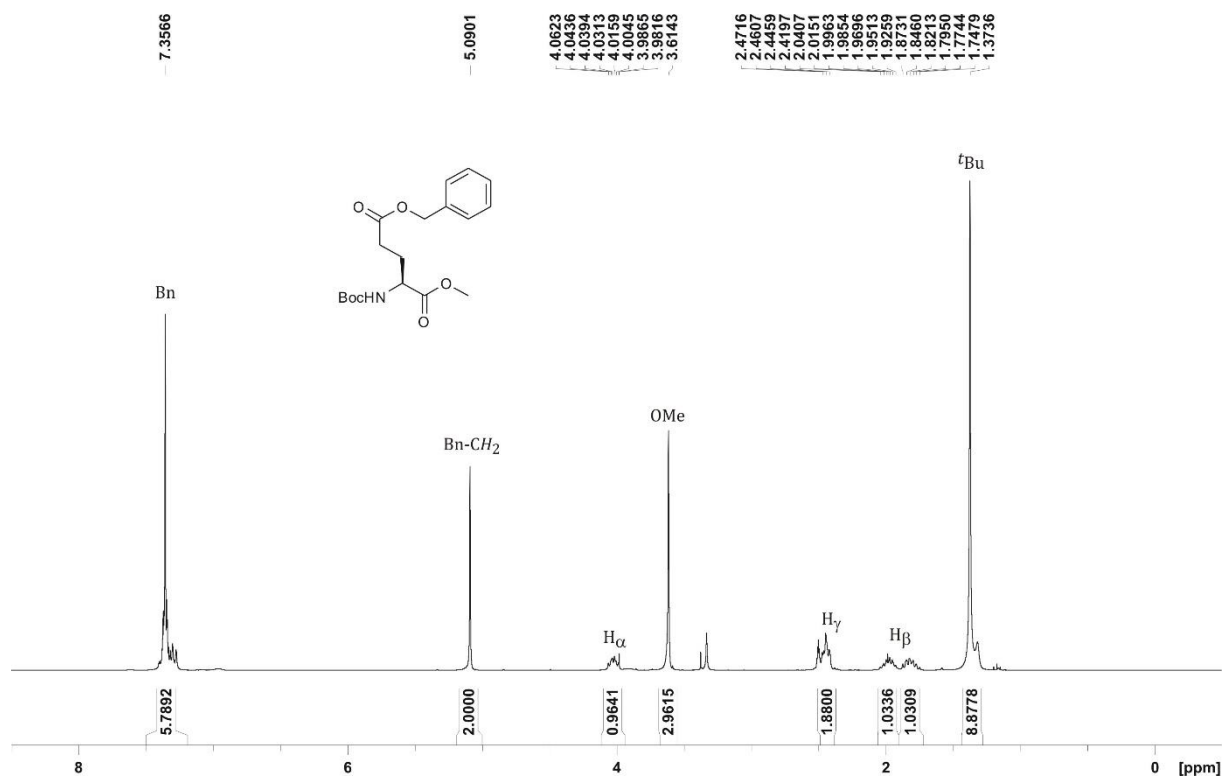
Boc-Glu(OBn)-OH wurde in Aceton gelöst und mit Kaliumcarbonat versetzt. Es wurde für 10 Min rühren gelassen und anschließend Dimethylsulfat zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur rühren gelassen. Es wurden 100 mL dest. Wasser zugegeben und drei Mal mit je 50 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die Titelverbindung **146** (14.6 mmol, 98%) wurde als farbloser, kristalliner Feststoff erhalten.

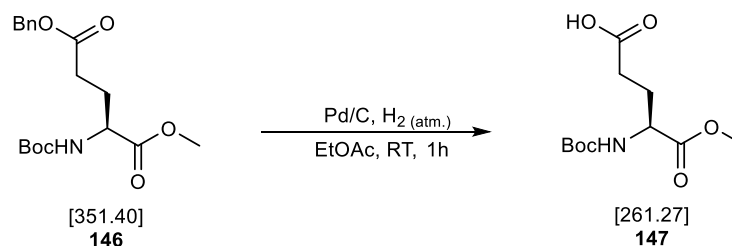
DC: $R_f = 0.70$ (Cyclohexan/Essigsäureethylester 1:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.41\text{--}7.25$ (m, 5H, Arom), 5.09 (s, 2H, Bn- CH_2), 4.02 (m, 1H, H_α), 3.61 (s, 3H, OCH_3), 2.48-2.39 (m, 2H, H_γ), 1.98 (m, 1H, H_β^t), 1.81 (m, 1H, H_β^h), 1.37 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 127.9$ (Arom), 65.3 (Bn- CH_2), 52.3 (C_α), 51.6 (OCH_3), 29.6 (C_γ), 27.7 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.6 (C_β) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_6]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 374.1574, gef.: 374.1575.



6.4.8.2 Dastellung von *N*-Boc-Glu-OMe (MPV017/ASSL39-3)

Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Boc-Glu(OBn)-OMe	351.40	7.31	1.00	2.57	
Pd/C	106.42	0.36	0.05	0.38	
EtOAc					20.0

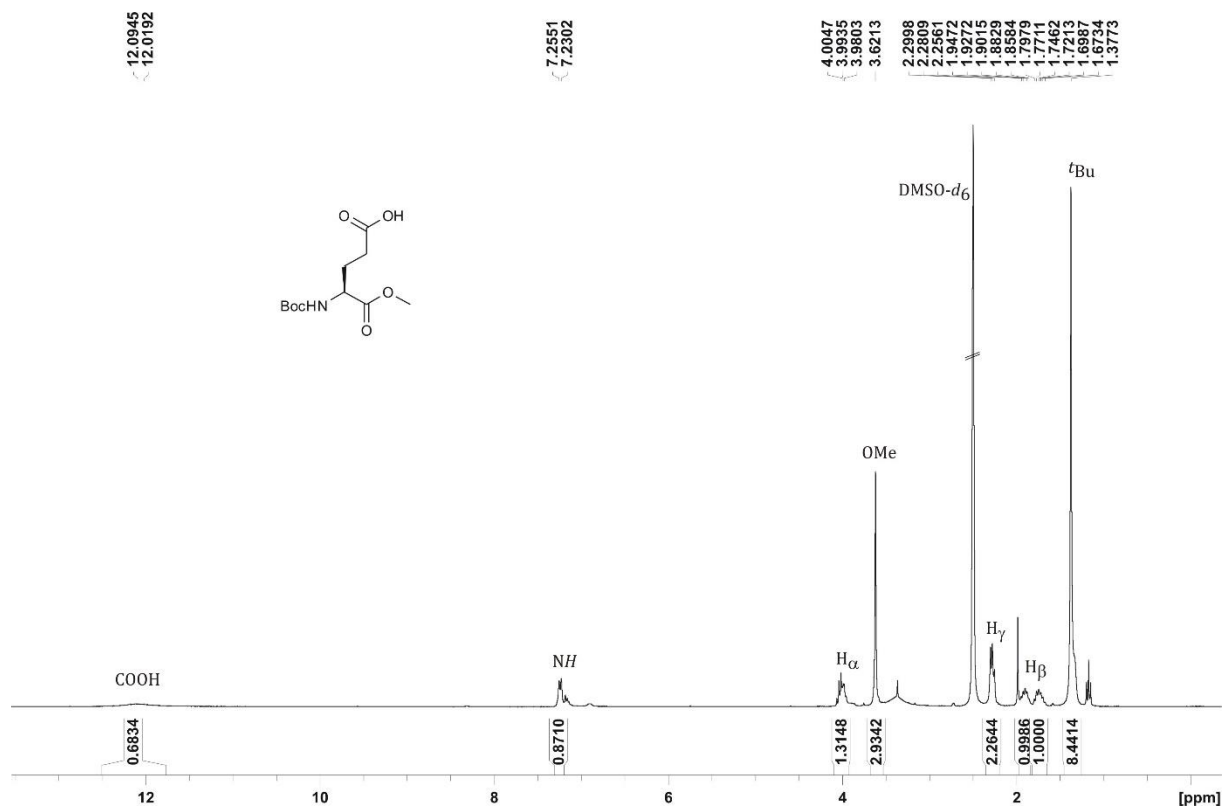
Durchführung:

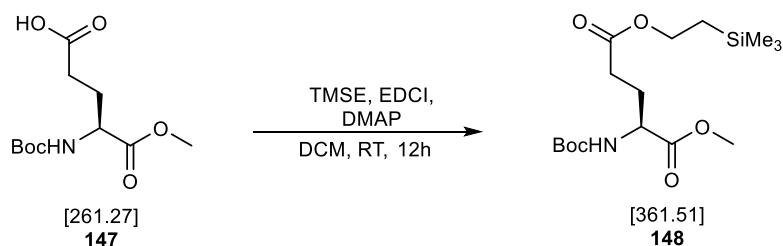
Das Benzyl-Geschützte Glutamat-Derivat **146** (2.57 g, 7.31 mmol, 1.00 eq.) wurde in 20 mL EtOAc aufgenommen. Nach Zugabe von Pd/C (0.38 g, 0.36 mmol, 0.05 eq.) wurde die Lösung mit Wasserstoffgas abgesättigt und die Lösung bis zum kompletten Umsatz rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter verminderten Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Das Produkt **147** wurde als farbloser Feststoff (1.81 g, 6.93 mmol, 95%) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 12.10 (s, 1H, COOH), 7.23 (d, 1H, 3J = 7.5 Hz, NH), 3.98-3.86 (ddd, 1H, H_α), 3.62 (s, 3H, OCH_3), 2.28 (dd, 2H, 3J = 7.5 Hz, 3J = 5.7 Hz, H_γ), 1.94-1.85 (m, 1H, H_β), 1.79-1.67 (m, 1H, H_β), 1.37 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 173.6 (COOH), 172.8 (COOMe), 155.5 (NHCO), 78.2 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 59.7 (C_α), 51.7 (OCH_3), 29.9 (C_β), 28.1 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.9 (C_γ) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_6]^+$ (M+Na); ber.: 284.1105, gef.: 284.1106.



6.4.8.3 Darstellung von *N*-Boc-Glu(OTMSE)-OMe (MPV023)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Boc-Glu-OMe	261.27	6.93	1.00	1.81	
EDCI·HCl	191.70	14.9	2.15	2.86	
DMAP	122.17	0.74	0.10	0.09	
2-(Trimethylsilyl)ethanol	118.25	11.2	1.60	1.32	1.60
DCM					50.0

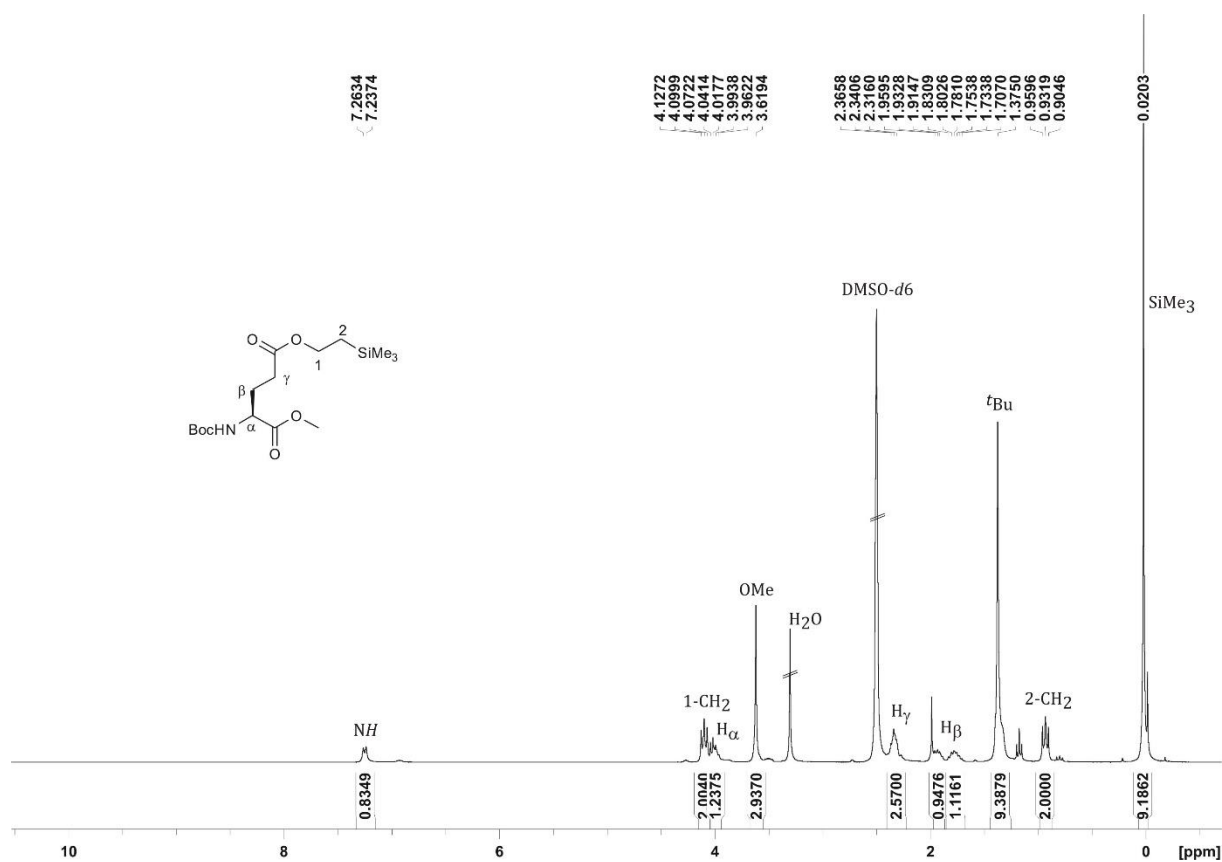
Durchführung:

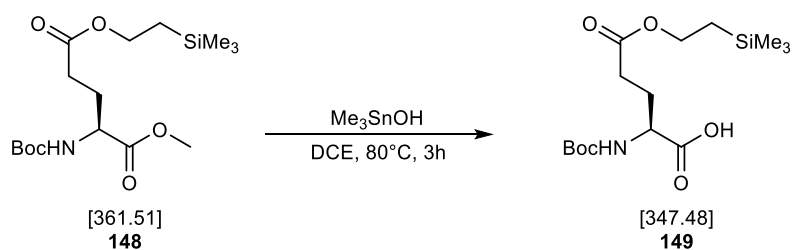
Boc-Glu-OMe (1.81 g, 6.93 mmol, 1.00 eq.) wurde in DCM gelöst und mit EDCI·HCl (2.86 g, 14.9 mmol, 2.15 eq.) versetzt. Nach 10 min wurde DMAP (0.09 g, 0.74 mmol, 0.11 eq.) und anschließend TMSE (1.60 mL, 11.2 mmol, 1.60 eq.) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde 12 h bei RT rühren gelassen. Anschließend wurde mit 20 mL DCM verdünnt und je drei Mal mit je 50 mL einer gesättigten Natriumhydrogencarbonat-Lösung, gesättigter Natriumchlorid-Lösung und Wasser extrahiert. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Cyclohexan/EtOAc 1:1) aufgereinigt. Das Produkt **148** wurde als farbloses Öl (1.53 g, 4.24 mmol, 61%) erhalten.

DC: $R_f = 0.71$ (Cyclohexan/EtOAc 1:1)

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; $\delta = 7.24$ (d, 1H, $^3J = 7.8$ Hz, NH), 4.09 (t, 2H, $^3J = 8.3$ Hz, 1- CH_2), 3.61 (s, 3H, OCH_3), 2.36-2.30 (m, 2H, H_γ), 1.97-1.88 (m, 1H, H_β), 1.83-1.71 (m, 1H, H_β), 1.37 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 0.93 (t, 2H, $^3J = 8.3$ Hz, 2- CH_2), 0.00 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{16}\text{H}_{31}\text{NO}_6\text{Si}]^+$ ($\text{M}+\text{Na}$); ber.: 384.1808, gef.: 384.1813.



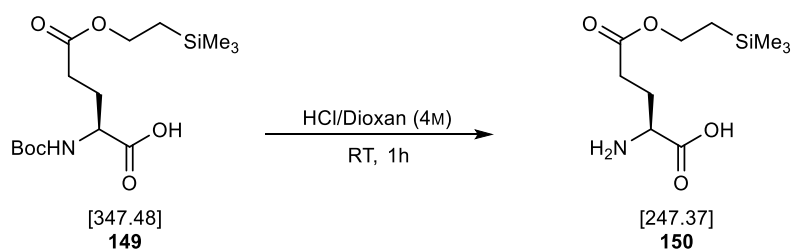
6.4.8.4 Dastellung von *N*-Boc-Glu(OTMSE)-OH (SLD377)**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
Boc-Glu(OTMSE)-OMe	361.51	0.91	1.00	328	
Trimethylzinnhydroxid	180.80	2.72	3.00	492	
DCE					20.0

Durchführung:

Die Methylester-geschützte Aminosäure **148** (328 mg, 0.91 mmol, 1.00 eq.) wurden in 20 mL 1,2-Dichlorethan gelöst und mit Trimethylzinnhydroxyd versetzt (492 mg, 2.72 mmol, 3.00 eq.). Es wurde unter Rückfluss bei 80 °C, bis zum vollständigen Umsatz erhitzt. Nach Abkühlen auf RT wurde die Reaktionsmischung mit EtOAc verdünnt, dreimal mit einer 0.2 N HCl-Lösung und einmal mit einer ges. NaCl-Lsg. gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Das Produkt **149** wurde als farbloses Öl (239 mg, 0.69 mmol, 76%) erhalten.

6.4.8.5 Dastellung von Glu(OTMSE)-OH (SLD379/MPV037)

**Ansatz:**

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [mg]	V [mL]
Boc-Glu(OTMSE)-OH	347.48	0.69	1.00	239	
HCl/Dioxan 4 M					10.0

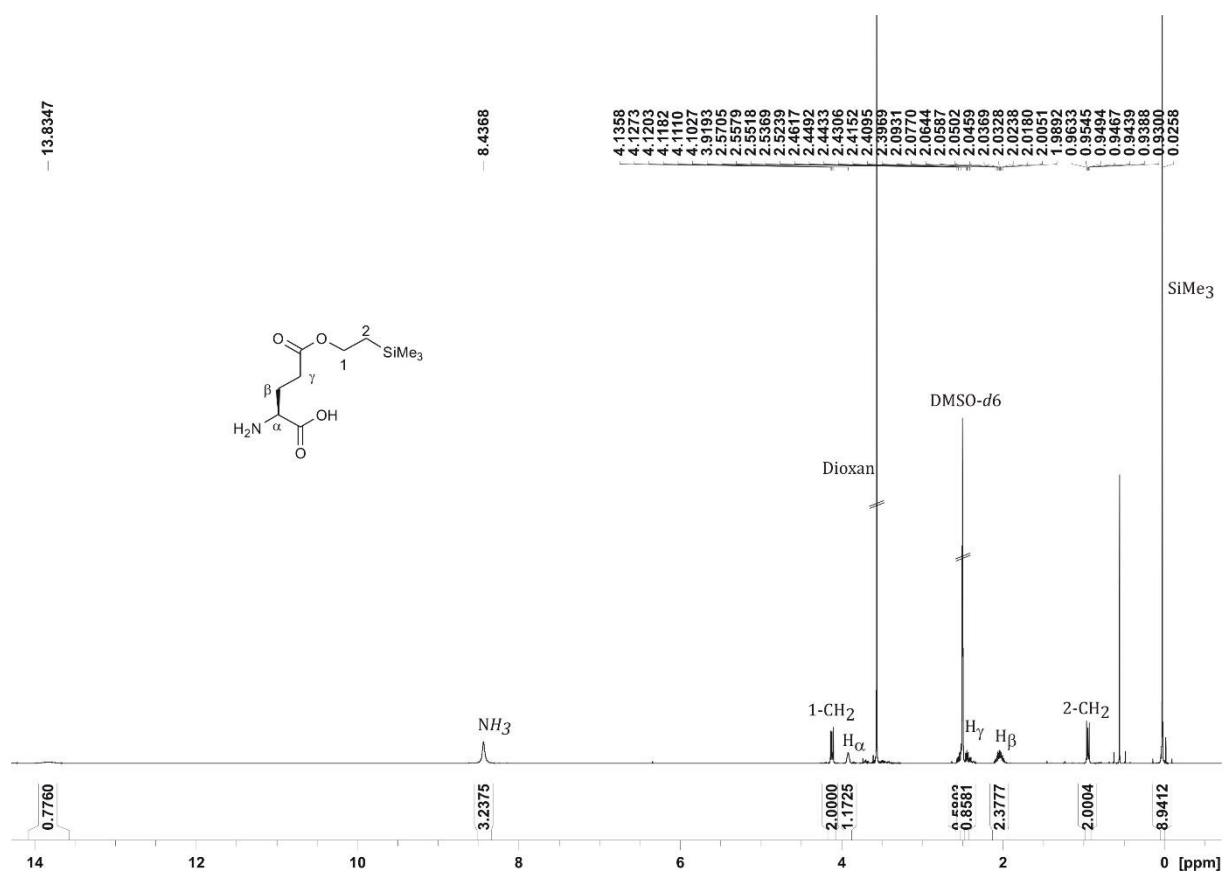
Durchführung:

Die Boc-geschützte Aminosäure **149** (239 mg, 0.69 mmol, 1.00 eq.) wurden mit 10 mL einer 4 M Lösung aus HCl in Dioxan versetzt. Die Lösung wurde für 1 h bei RT gerührt. Nach vollständiger Umsetzung wurde das überschüssige HCl mit Argon-Gas ausgetrieben und das Lösungsmittel unter verminderten Druck entfernt. Das Produkt **150** wurde als farbloser Feststoff (196 mg, 0.69 mmol, quant.) erhalten.

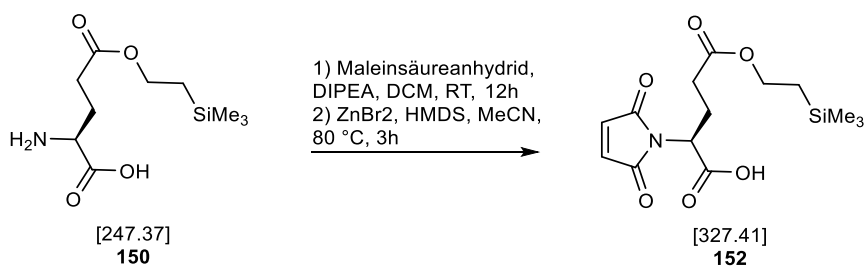
$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 8.44 (s, 3H, NH_3^+), 4.11 (m, 2H, 1- CH_2), 3.91 (m, 1H, H_α), 2.51-2.35 (m, 2H, H_γ), 2.10-1.97 (m, 2H, H_β), 0.94 (m, 2H, 2- CH_2), 0.02 (s, 9H, $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 75.5 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 61.9 (1-C), 50.9 (C_α), 29.1 (C_γ), 25.0 (C_β), 16.5 (2-C), -1.7 (SiMe_3) ppm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{10}\text{H}_{22}\text{NO}_4\text{Si}]^+$ (M+H); ber.: 248.1313, gef.: 248.1313.



6.4.8.6 Darstellung von Mal=Glu(OTMSE)-OH (SLD382)



Ansatz:

Edukte und Reagenzien	M [g/mol]	n [mmol]	eq	m [g]	V [mL]
H ₂ N-Glu(OTMSE)-OH	261.39	1.66	1.00	0.43	
Maleinsäureanhydrid	98.06	2.49	1.50	0.24	
DIPEA	129.25	1.66	1.00	0.21	0.29
DCM					20.0
ZnBr ₂	225.18	1.66	1.00	0.37	
HMDS	161.39	8.30	5.00	1.34	1.72
MeCN					25.0

Durchführung:

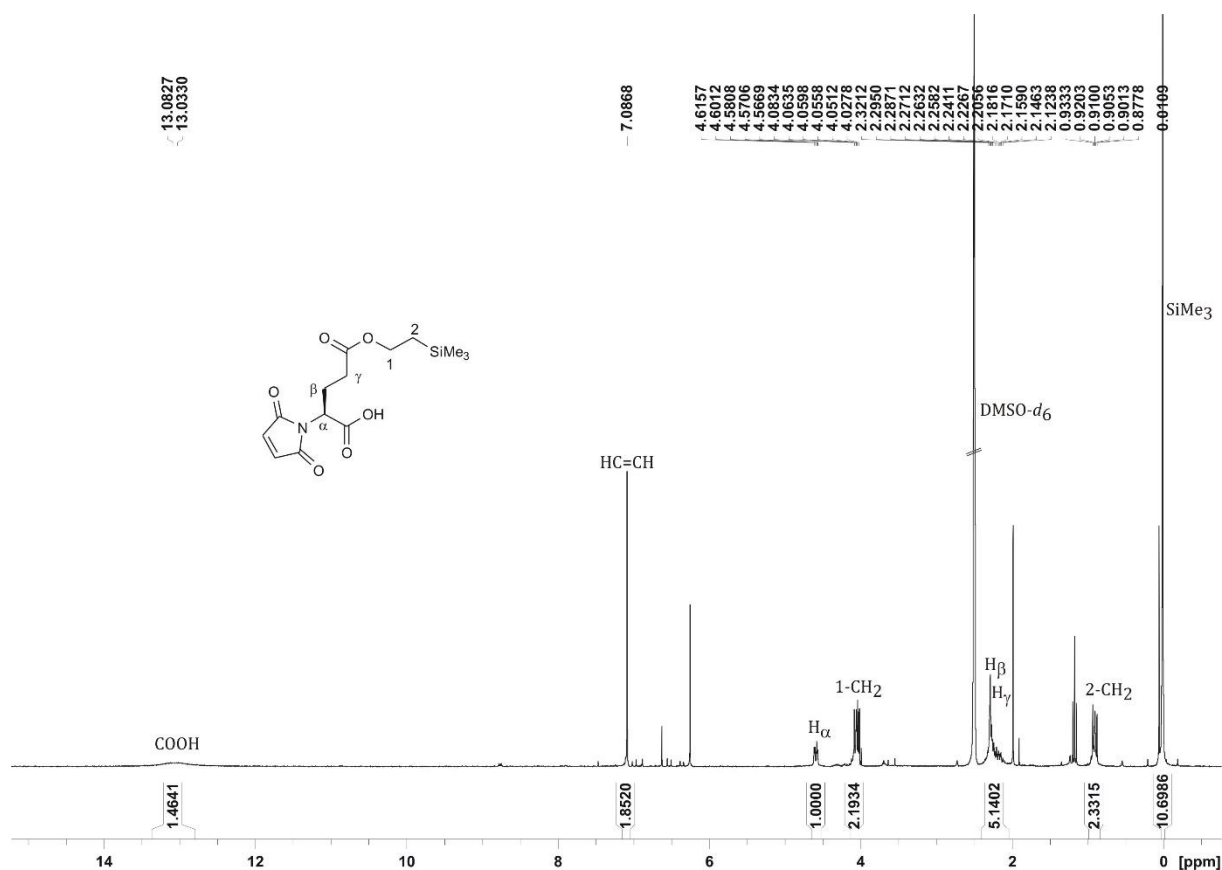
Die Aminosäure **150** (0.43 g, 1.66 mmol, 1.00 eq) wurde in 20.0 mL DCM gelöst und mit DIPEA (290 µL, 1.66 mmol, 1.00 eq) versetzt. Nach der Zugabe von Maleinsäureanhydrid (0.24 g, 2.49 mmol, 1.50 eq) wurde das Reaktionsgemisch für 12 h bei RT rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Der Rückstand wurde ohne weitere Aufreinigung in Acetonitril aufgenommen und mit Zinkbromid (374 mg, 1.66 mmol, 1.00 eq) versetzt. Nach der langsamen Zugabe von HMDS (1.72 mL, 8.30 mmol, 5.00 eq) wurde das Reaktionsgemisch auf 80 °C erwärmt und für 3 h bei dieser Temperatur rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde unter vermindertem Druck entfernt und der Rückstand am Feinvakuum getrocknet. Anschließend wurde der Rückstand in 20.0 mL einer 0.5 M HCl-Lösung aufgenommen und drei Mal mit je 25.0 mL Essigsäureethylester extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Magnesiumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Der Rückstand wurde am Feinvakuum

getrocknet. Die Titelverbindung **152** wurde als brauner Feststoff (432 mg, 1.32 mmol, 80%) erhalten.

$^1\text{H-NMR}$: 300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 13.08 (s, 1H, COOH), 7.08 (s, 2H, =CH-), 4.59 (dd, 2H, 3J = 4.4 Hz, 3J = 10.4 Hz, H_α), 4.10-4.03 (m, 2H, 1-CH₂), 2.40-2.06 (m, 4H, H_β , H_γ), 0.95-0.85 (m, 2H, 2-CH₂), 0.01 (s, 9H, Si(CH₃)₃) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$: 125 MHz, $\text{DMSO-}d_6$; δ = 134.5 (C=C), 61.8 (1-C), 50.4 (C_α), 30.0 (C_γ), 23.5 (C_β), 16.5 (2-C), -1.6 (SiMe₃) ppm.

HR-MS (ESI): für [C₁₄H₂₁NO₆Si]⁺ (M+Na); ber.: 350.1030, gef.: 350.1034.



6.5 Festphasensynthese linearen Vorläuferpeptide für die STL

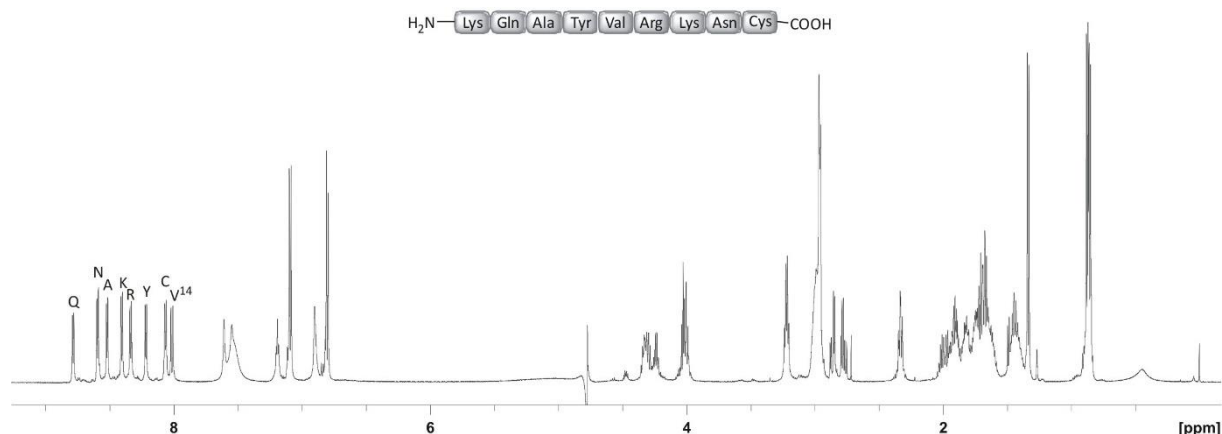
6.5.1 KQAYVRKNC (AH26)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 3.75$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₄₇H₅₀N₈O₉S]⁺ (M+H); ber.: 1109.5884; gef.: 1109.5887.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.89	H _γ	1.44
					H _δ	1.70
					H _ε	2.99
11	Gln	8.78	4.33	1.98	H _γ	2.33
12	Ala	8.52	4.28	1.33		
13	Tyr	8.21	4.57	2.96	2,6-H	7.09
					3,5-H	6.80
14	Val	8.01	4.00	1.91	H _γ	0.87; 0.85
15	Arg	8.33	4.24	1.82; 1.75	H _γ	1.63
					H _δ	3.21
					NH _ε	7.19
16	Lys	8.40	4.31	1.82	H _γ	1.43; 1.41
					H _δ	1.75; 1.68
					H _ε	2.97
17	Asn	8.59	4.71	2.85; 2.78		
<i>C</i> -term	Cys	8.06	4.47	2.96		

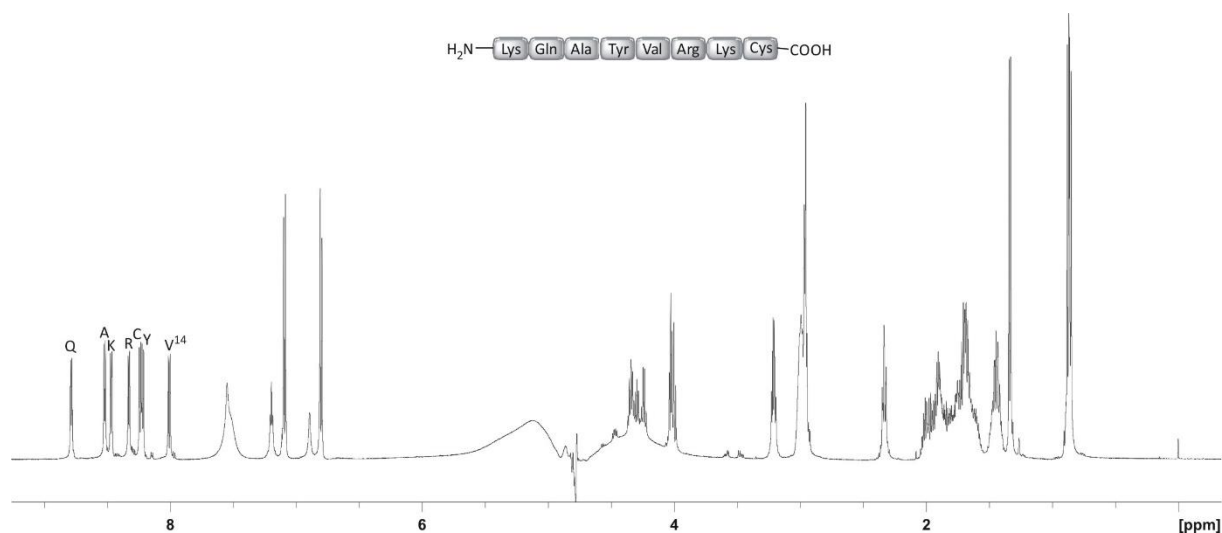
6.5.2 KQAYVRKC (SLD192)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.25$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₄₃H₇₄N₁₄O₁₁S]⁺ (M+H); ber.: 995.5455; gef.: 995.5446.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Experimenteller Teil

Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.90	H _γ	1.44
					H _δ	1.71
					H _ε	3.01
11	Gln	8.78	4.34	1.99	H _γ	2.35
12	Ala	8.52	4.29	1.33		
13	Tyr	8.23	4.57	2.95	2,6-H	7.09
					3,5-H	6.80
14	Val	8.00	4.01	1.92	H _γ	0.87; 0.85
15	Arg	8.33	4.25	1.82; 1.75	H _γ	1.62
					H _δ	3.21
					NH _ε	7.19
16	Lys	8.46	4.34	1.85; 1.76	H _γ	1.45
					H _δ	1.69
					H _ε	2.98
<i>C</i> -term	Cys	8.21	4.48	2.96		

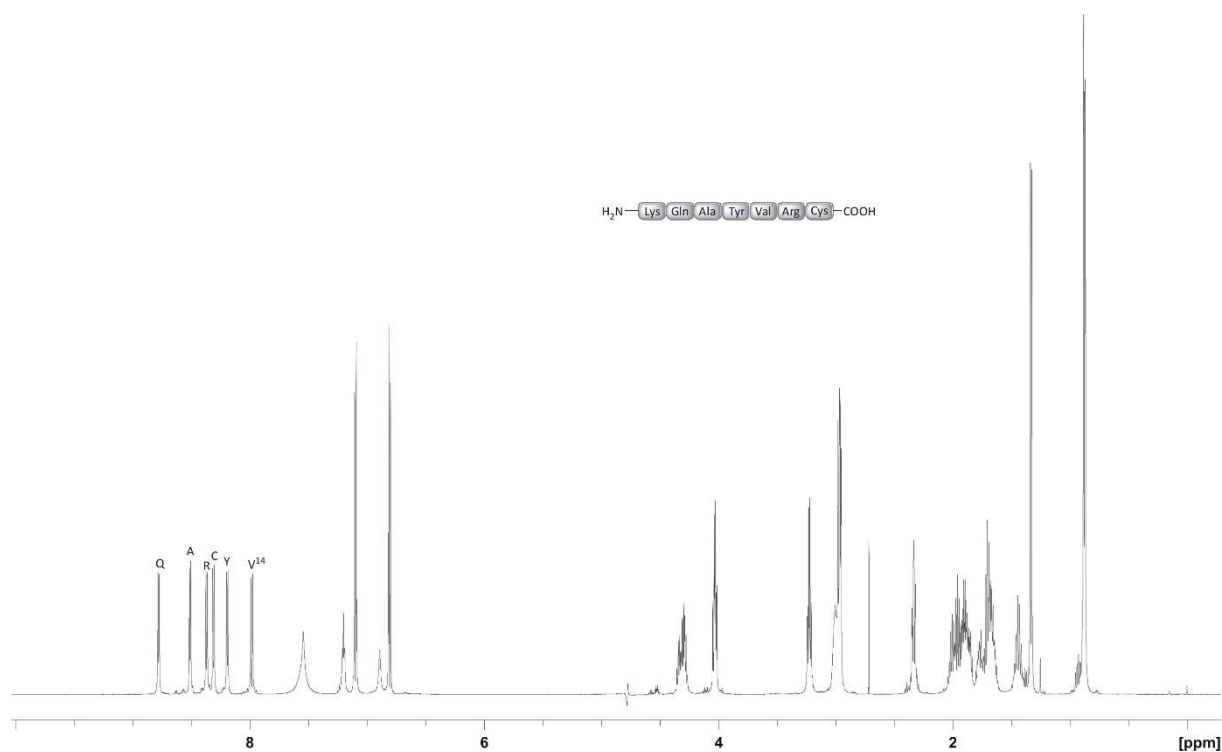
6.5.3 KQAYVRC (SLD194/AH24)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 5.02$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₃₇H₆₂N₁₂O₁₀S]⁺ (M+H); ber.: 867.4505; gef.: 867.4499.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.90	H _γ	1.44
					H _δ	1.71
					H _ε	2.99
11	Gln	8.78	4.33	1.98	H _γ	2.33
12	Ala	8.51	4.29	1.33		
13	Tyr	8.19	4.58	2.98	2,6-H	7.09
					3,5-H	6.80
14	Val	7.98	4.03	1.94	H _γ	0.88; 0.87
15	Arg	8.36	4.31	1.86; 1.76	H _γ	1.67
					H _δ	3.22
					NH _ε	7.20
<i>C</i> -term	Cys	8.31	4.52	2.96		

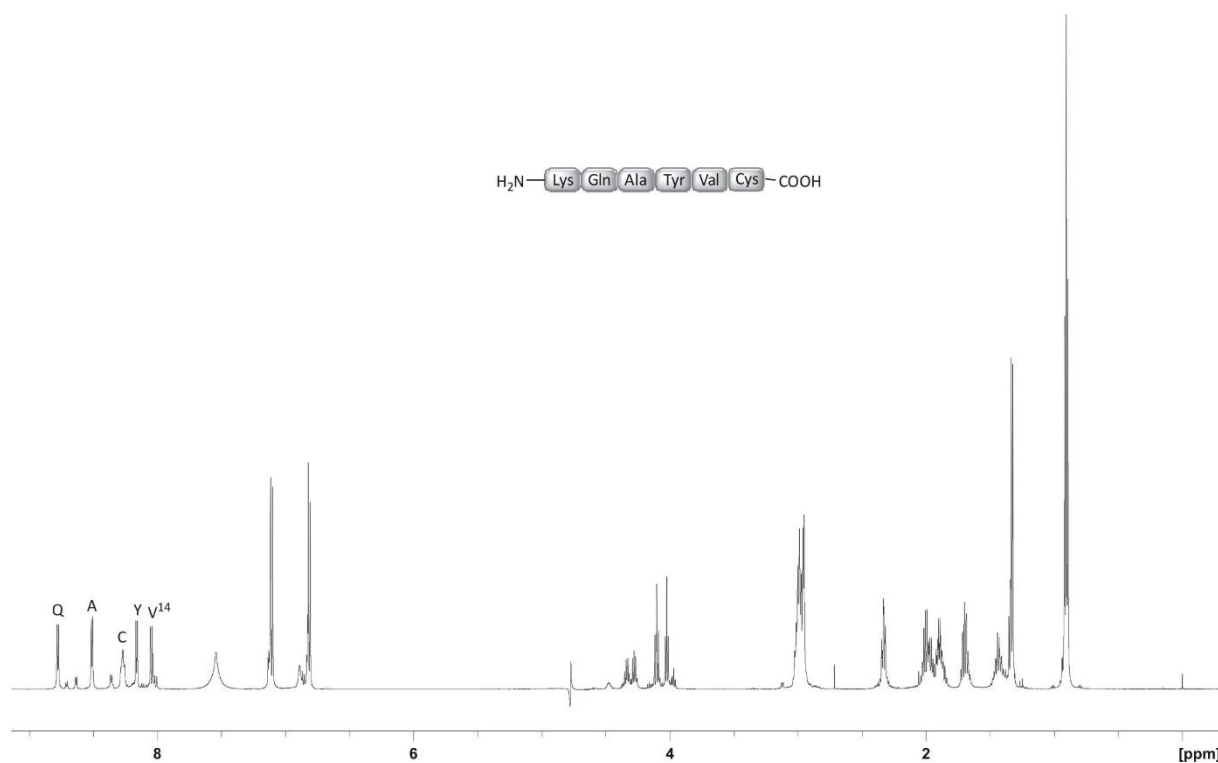
6.5.4 KQAYVC (SLD197/AH25)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 5.22$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₃₁H₅₀N₈O₉S]⁺ (M+H); ber.: 711.3494; gef.: 711.3487.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.90	H _γ	1.44
					H _δ	1.71
					H _ε	3.00
11	Gln	8.77	4.34	1.98	H _γ	2.33
12	Ala	8.51	4.28	1.33		
13	Tyr	8.16	4.60	3.00	2,6-H	7.11
					3,5-H	6.81
14	Val	8.04	4.11	2.00	H _γ	0.91; 0.89
<i>C</i> -term	Cys	8.27	4.48	2.96		

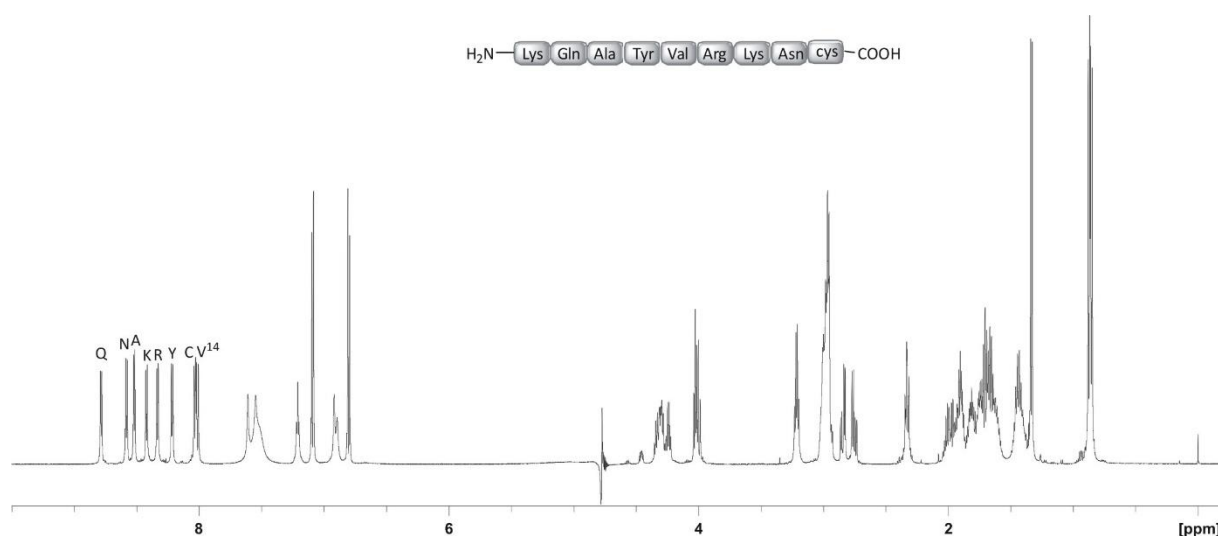
6.5.5 KQAYVRKNc (AH41)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.02$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₄₇H₅₀N₈O₉S]⁺ (M+H); ber.: 1109.5884; gef.: 1109.5884.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.90	H _γ	1.44
					H _δ	1.72
					H _ε	3.01
11	Gln	8.78	4.34	1.99	H _γ	2.33
12	Ala	8.52	4.30	1.33		
13	Tyr	8.21	4.58	2.97	2,6-H	7.09
					3,5-H	6.80
14	Val	8.01	4.02	1.92	H _γ	0.87; 0.85
15	Arg	8.33	4.25	1.83; 1.76	H _γ	1.62
					H _δ	3.22
					NH _ε	7.21
16	Lys	8.42	4.32	1.83; 1.76	H _γ	1.43
					H _δ	1.67
					H _ε	2.98
17	Asn	8.58	4.77	2.85; 2.75		
<i>C</i> -term	Cys	8.03	4.46	2.98		

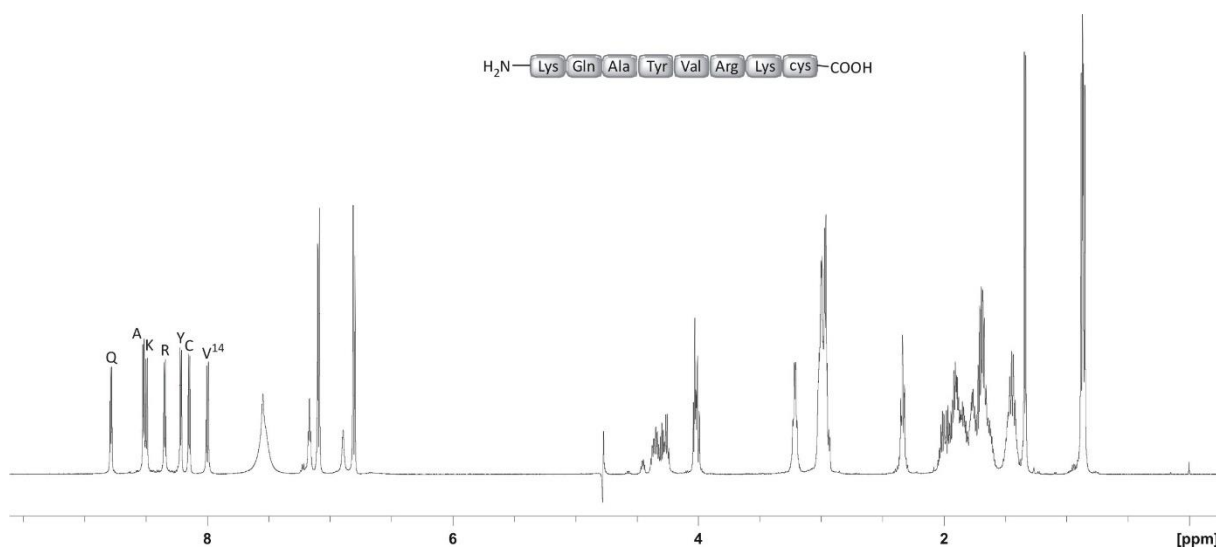
6.5.6 KQAYVRKc (AH38)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.19$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₄₃H₇₄N₁₄O₁₁S]⁺ (M+H); ber.: 995.5455; gef.: 995.5455.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Experimenteller Teil

Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.02	1.90	H _γ	1.44
					H _δ	1.69
					H _ε	3.00
11	Gln	8.78	4.32	1.97	H _γ	2.32
12	Ala	8.52	4.27	1.33		
13	Tyr	8.21	4.55	2.95	2,6-H	7.09
					3,5-H	6.80
14	Val	7.99	3.99	1.91	H _γ	0.87; 0.85
15	Arg	8.34	4.25	1.83; 1.76	H _γ	1.63
					H _δ	3.20
					NH _ε	7.16
16	Lys	8.49	4.35	1.85; 1.76	H _γ	1.44
					H _δ	1.66
					H _ε	2.98
<i>C</i> -term	Cys	8.14	4.43	3.00; 2.93		

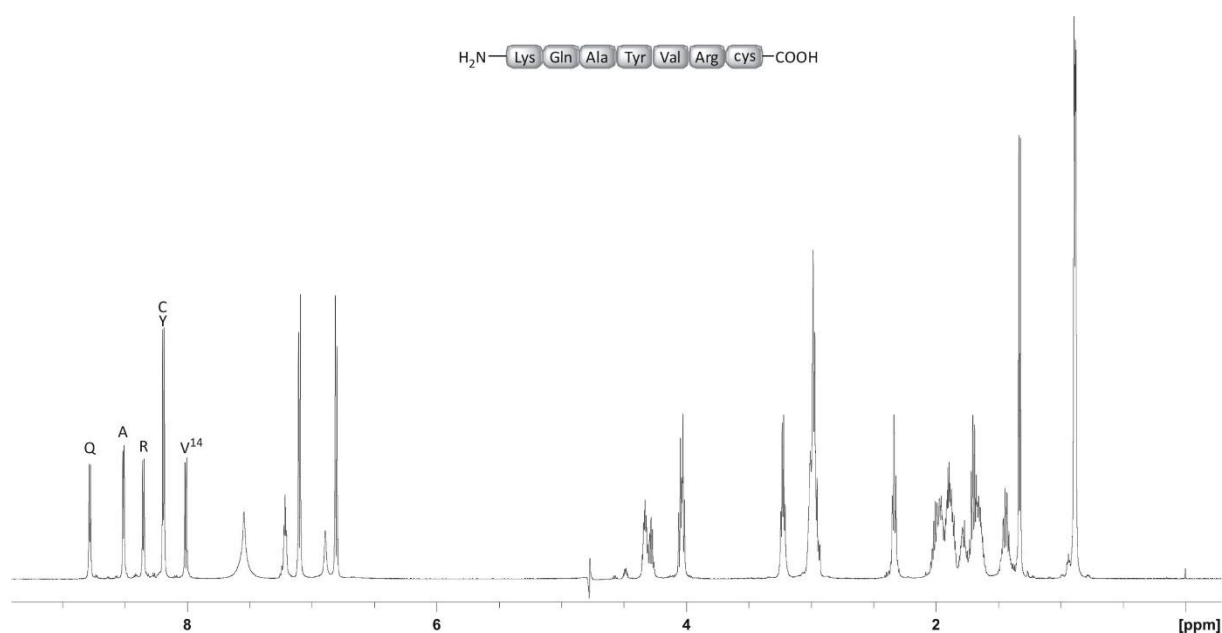
6.5.7 KQAYVRc (AH39)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.97$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₃₇H₆₂N₁₂O₁₀S]⁺ (M+H); ber.: 867.4505; gef.: 867.4502.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Experimenteller Teil

Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.02	1.90	H _γ	1.45
					H _δ	1.70
					H _ε	3.02
11	Gln	8.78	4.33	1.98	H _γ	2.34
12	Ala	8.51	4.29	1.32		
13	Tyr	8.18	4.58	2.97	2,6-H	7.10
					3,5-H	6.80
14	Val	8.01	4.05	1.97	H _γ	0.88
15	Arg	8.35	4.33	1.87; 1.78	H _γ	1.66
					H _δ	3.23
					NH _ε	7.21
<i>C</i> -term	Cys	8.18	4.48	2.97		

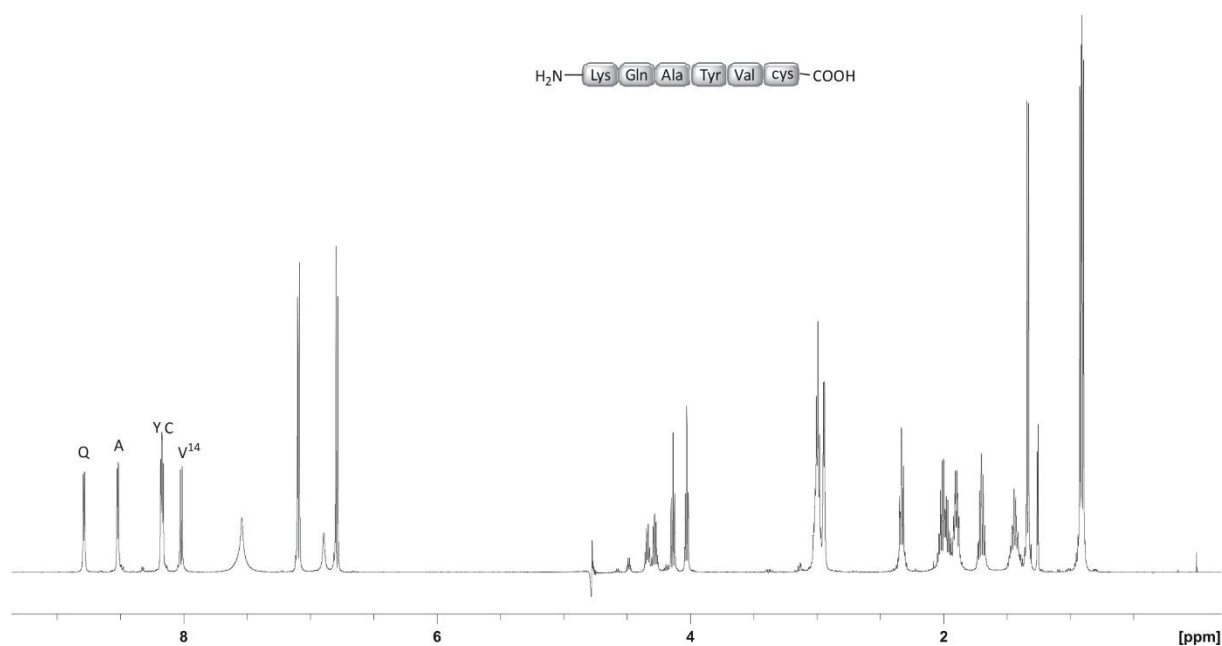
6.5.8 KQAYVc (AH40)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 5.91$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₃₁H₅₀N₈O₉S]⁺ (M+H); ber.: 711.3494; gef.: 711.3487.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.89	H _γ	1.44
					H _δ	1.71
					H _ε	3.00
11	Gln	8.78	4.34	1.98	H _γ	2.33
12	Ala	8.52	4.28	1.33		
13	Tyr	8.17	4.57	2.99	2,6-H	7.09
					3,5-H	6.79
14	Val	8.02	4.14	2.01	H _γ	0.91; 0.89
<i>C</i> -term	Cys	8.16	4.48	2.95		

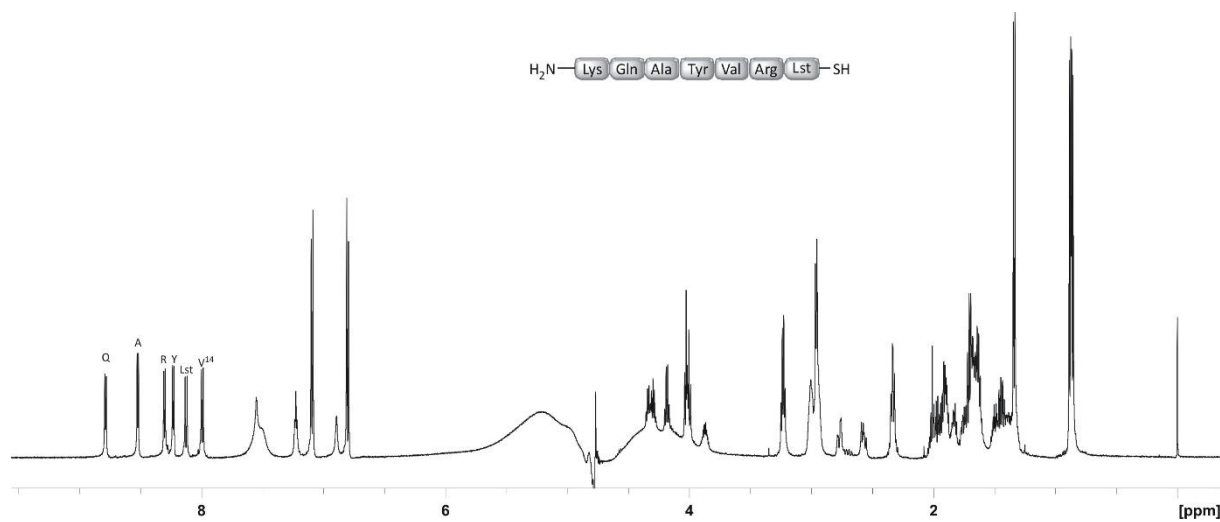
6.5.9 KQAYVRA (Λ = Lst), (ASSL30)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: t_s = 1.55 min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C_{18} 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{40}H_{71}N_{13}O_8S]^+$ (M+2H); ber.: 447.7707; gef.: 447.7702.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.04	1.83	H _γ	1.45
					H _δ	1.71
					H _ε	3.02
11	Gln	8.78	4.34	1.99	H _γ	2.35
12	Ala	8.52	4.29	1.34		
13	Tyr	8.23	4.58	2.95	2,6-H	7.09
					3,5-H	6.80
14	Val	7.99	4.01	1.92	H _γ	0.88; 0.86
15	Arg	8.30	4.18	1.83; 1.76	H _γ	1.69
					H _δ	3.23
<i>S</i> -term	Lst	8.12	3.87	1.50	H _β '	2.77; 2.57
					H _γ	1.38
					H _δ	1.64
					H _ε	2.95

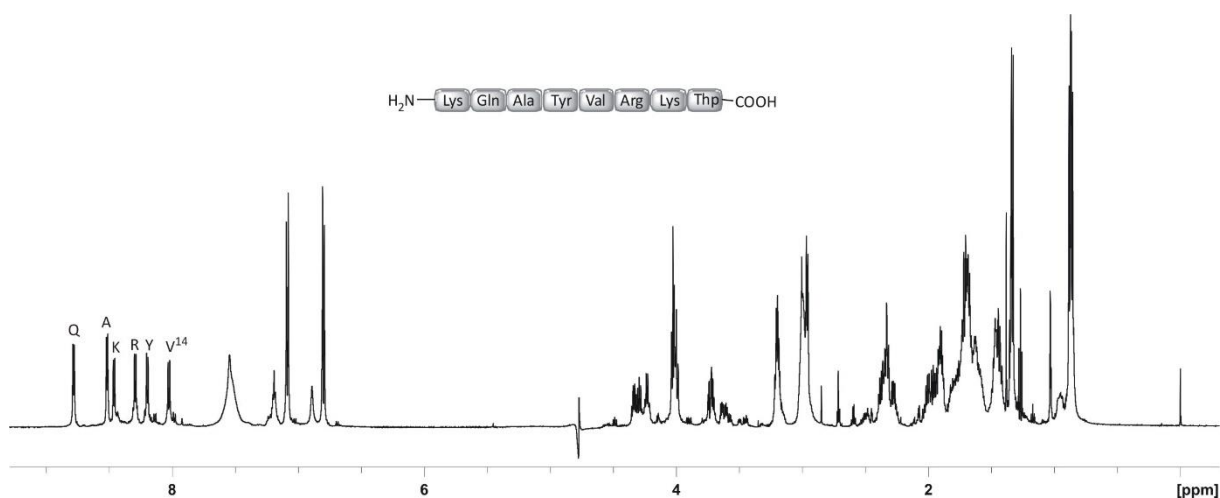
6.5.10 KQAYVRK-Thp (SLD386)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde ohne präparative HPLC-Aufreinigung in der Ligation eingesetzt.

HPLC: $t_s = 3.28$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C_{18} 3 μm , 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{45}\text{H}_{76}\text{N}_{14}\text{O}_{11}\text{S}]^+$ (M+H); ber.: 1021.5611; gef.: 1021.5629.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.89	H _γ	1.44
					H _δ	1.69
					H _ε	2.99
11	Gln	8.78	4.33	1.97	H _γ	2.32
12	Ala	8.51	4.28	1.33		
13	Tyr	8.19	4.56	2.95	2,6-H	7.08
					3,5-H	6.80
14	Val	8.02	4.00	1.92	H _γ	0.88; 0.86
15	Arg	8.29	4.32	1.78; 1.73	H _γ	1.59
					H _δ	3.19
					NH _ε	7.20
16	Lys	8.46	4.54	1.82	H _γ	1.46
					H _δ	1.62
					H _ε	2.98
<i>C</i> -term	Thp	-	4.48	2.37; 2.27	H _γ	3.70
					H _δ	4.02; 3.72

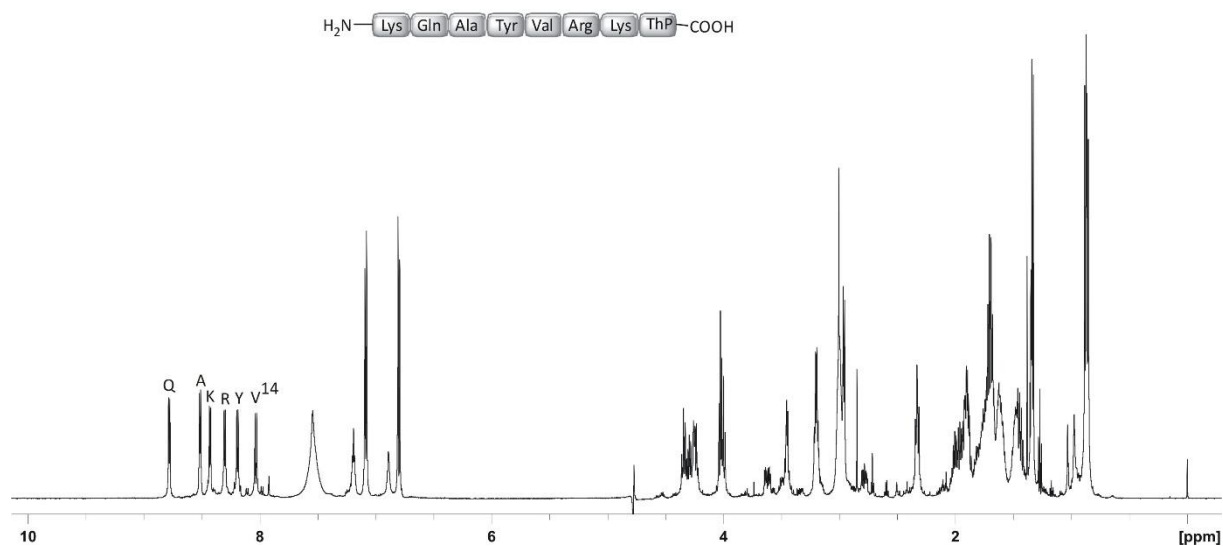
6.5.11 KQAYVRK-ThP (SLD418)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde ohne präparative HPLC-Aufreinigung in der Ligation eingesetzt.

HPLC: $t_s = 3.30$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C₁₈ 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für [C₄₅H₇₆N₁₄OS]⁺ (M+H); ber.: 1021.5611; gef.: 1021.5629.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Experimenteller Teil

Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.02	1.90	H _γ	1.43
					H _δ	1.70
					H _ε	3.00
11	Gln	8.78	4.33	1.97	H _γ	2.33
12	Ala	8.52	4.29	1.33		
13	Tyr	8.19	4.57	2.96	2,6-H	7.08
					3,5-H	6.80
14	Val	8.03	4.00	1.92	H _γ	0.86
15	Arg	8.30	4.24	1.75	H _γ	1.60
					H _δ	3.20
					NH _ε	7.19
16	Lys	8.43	4.53	1.81	H _γ	1.48
					H _δ	1.72
					H _ε	2.99
<i>C</i> -term	ThP	-	4.35	1.88; 2.78	H _γ	3.45
					H _δ	4.25; 3.45

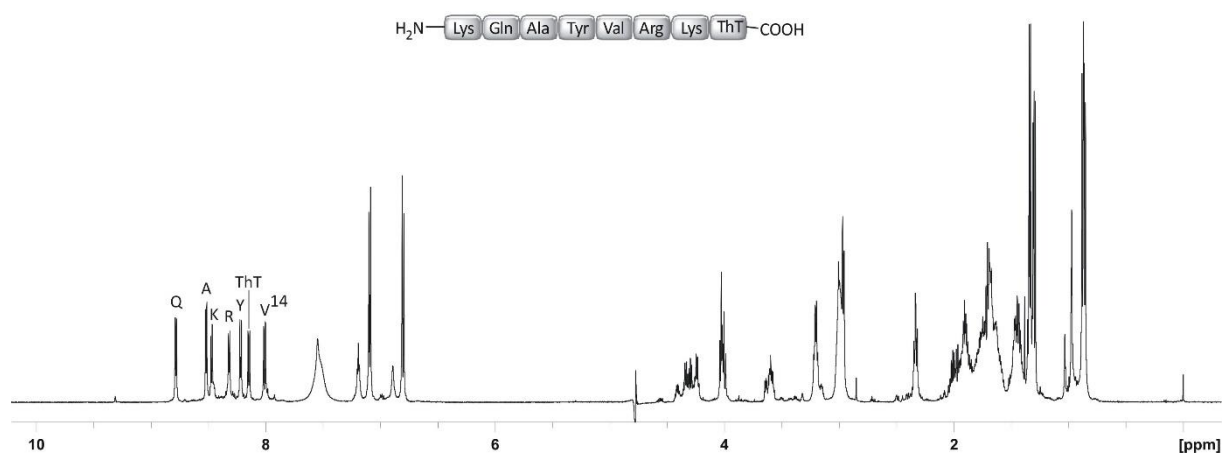
6.5.12 KQAYVRK-ThT (SLD450)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde ohne präparative HPLC-Aufreinigung in der Ligation eingesetzt.

HPLC: $t_s = 3.34$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C_{18} 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{44}H_{76}N_{14}O_{11}S]^+$ (M+H); ber.: 1010.5639; gef.: 1010.5650.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.90	H _γ	1.44
					H _δ	1.70
					H _ε	3.01
11	Gln	8.78	4.33	1.98	H _γ	2.34
12	Ala	8.52	4.29	1.33		
13	Tyr	8.22	4.57	2.97	2,6-H	7.09
					3,5-H	6.80
14	Val	8.01	4.00	1.9	H _γ	0.8; 0.8
15	Arg	8.32	4.24	1.80; 1.75	H _γ	1.61
					H _δ	3.20
					NH _ε	7.12
16	Lys	8.47	4.40	1.87	H _γ	1.44
					H _δ	1.75
					H _ε	2.99
<i>C</i> -term	ThT	8.14	4.55	3.58	H _γ	1.29

Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Mal	-			DoBi	6.89
17	Gly	-	4.34			
18	Gly	8.54	3.87; 3.86			
19	Glu	8.21	4.25	1.88	H_{γ}	2.24
20	Trp	8.03	4.64	3.29; 3.17	2-H	7.21
					4-H	7.48
					5-H	7.23
					6-H	7.15
					7-H	7.60
					NH_{ϵ}	10.08
21	Val	7.70	3.96	1.95	H_{γ}	0.83
22	Leu	8.02	4.28	1.57	H_{γ}	1.57
					H_{δ}	0.92; 0.87
23	Leu	8.15	4.38	1.63	H_{γ}	1.64
					H_{δ}	0.89; 0.84
24	Ser	8.13	4.45	3.82		
<i>C</i> -term	Gly	8.16	3.96			

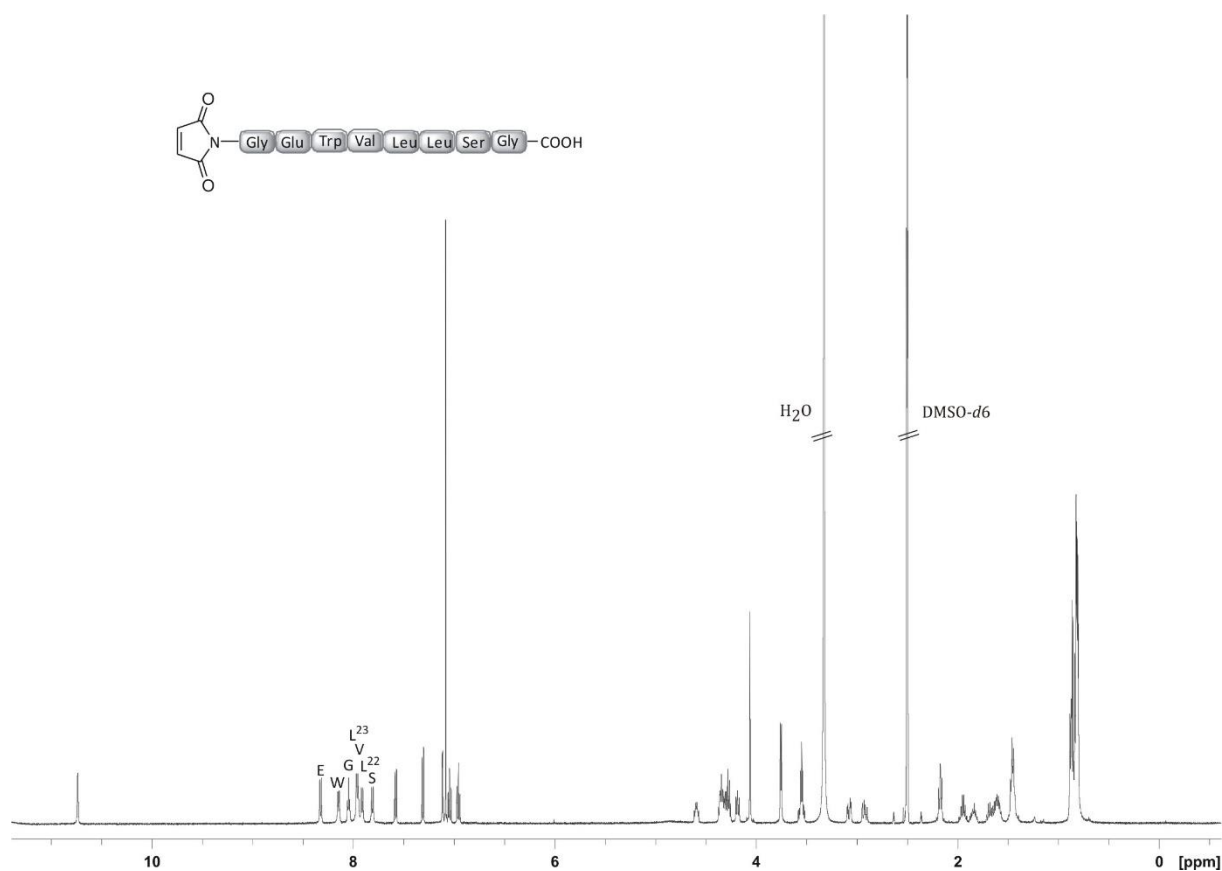
6.5.14 MalGEWVLLSG (SLD195)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 10.70$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₄₄H₆₁N₉O₁₄]⁺ (M+Na); ber.: 962.4230; gef.: 962.4233.

NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆.



Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Mal	-			DoBi	7.08
18	Gly	-	4.06			
19	Glu	8.32	4.30	1.84; 1.68	H _γ	2.17
20	Trp	8.15	4.59	3.07; 2.92	2-H	7.11
					4-H	7.31
					5-H	7.04
					6-H	6.95
					7-H	7.58
					NH _ε	10.73
21	Val	7.96	4.18	1.95	H _γ	0.82
22	Leu	7.91	4.35	1.45	H _γ	1.63
					H _δ	0.83
23	Leu	7.97	4.34	1.45	H _γ	1.65
					H _δ	0.81
24	Ser	7.81	4.28	3.55		
<i>C</i> -term	Gly	8.05	3.75			

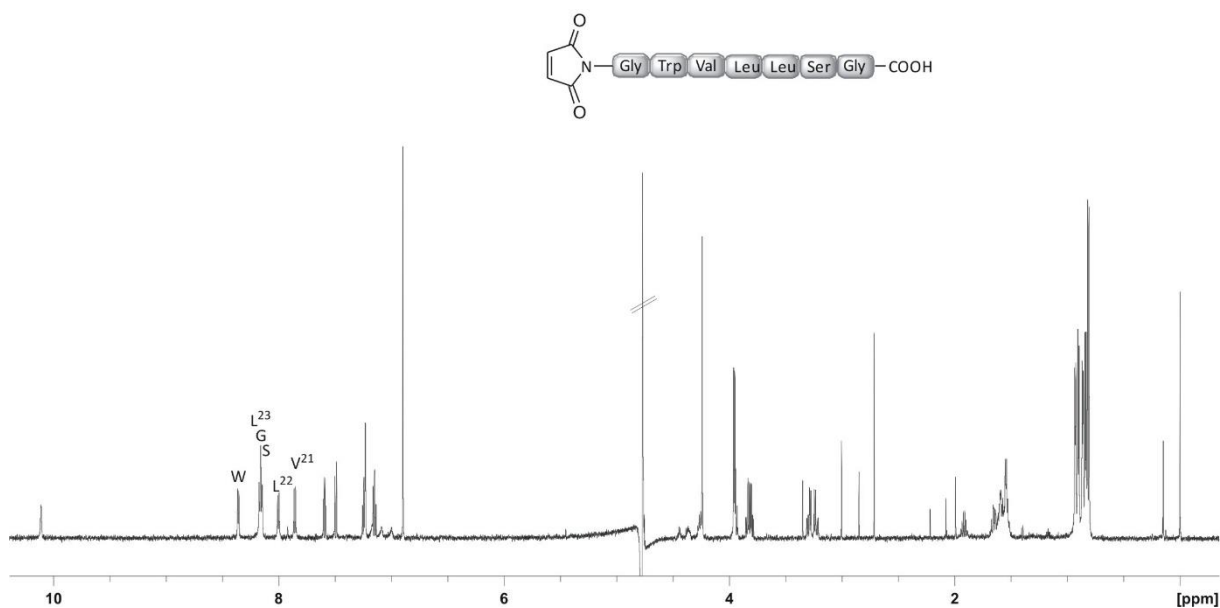
6.5.15 MalGWVLLSG (SLD193)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 11.63$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₃₉H₅₄N₈O₁₁]⁺ (M+Na); ber.: 833.3804; gef.: 833.3804.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Mal	-			DoBi	6.89
19	Gly	-	4.24			
20	Trp	8.36	4.65	3.29; 3.22	2-H	7.23
					4-H	7.49
					5-H	7.24
					6-H	7.15
					7-H	7.59
					NH _ε	10.11
21	Val	7.85	3.93	1.91	H _γ	0.81
22	Leu	8.00	4.26	1.54	H _γ	1.54
					H _δ	0.93; 0.86
23	Leu	8.17	4.37	1.66	H _γ	1.58
					H _δ	0.90; 0.84
24	Ser	8.15	4.44	3.83; 3.80		
<i>C</i> -term	Gly	8.16	3.96			

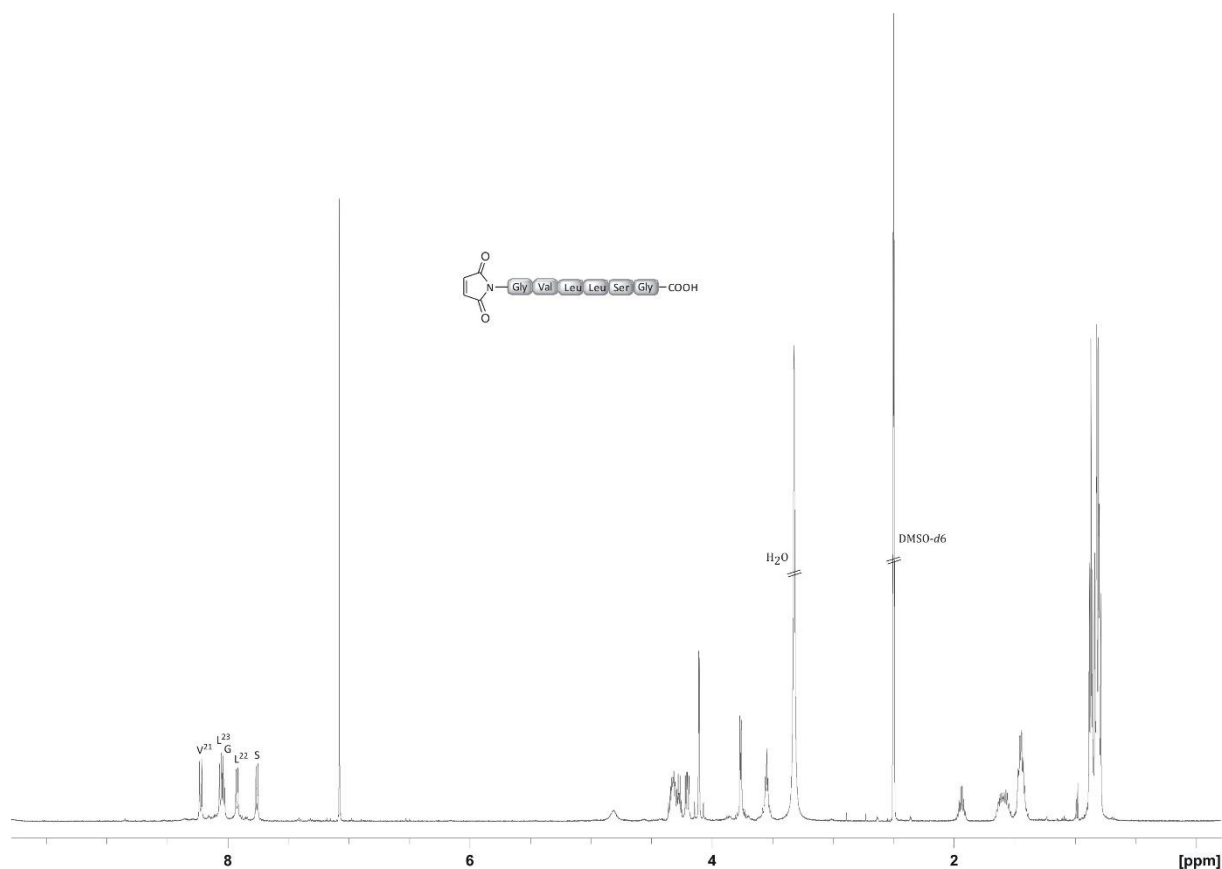
6.5.16 MalGVLLSG (AH19)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 9.24$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₂₈H₄₄N₆O₁₀]⁺ (M+Na); ber.: 647.3011; gef.: 647.3006.

NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆.



Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Mal	-			DoBi	7.08
20	Gly	-	4.11			
21	Val	8.22	4.20	1.94	H _γ	0.80
22	Leu	7.96	4.33	1.45	H _γ	1.60
					H _δ	0.83
23	Leu	8.06	4.30	1.43	H _γ	1.56
					H _δ	0.85
24	Ser	7.76	4.26	3.55		
<i>C</i> -term	Gly	8.03	3.76			

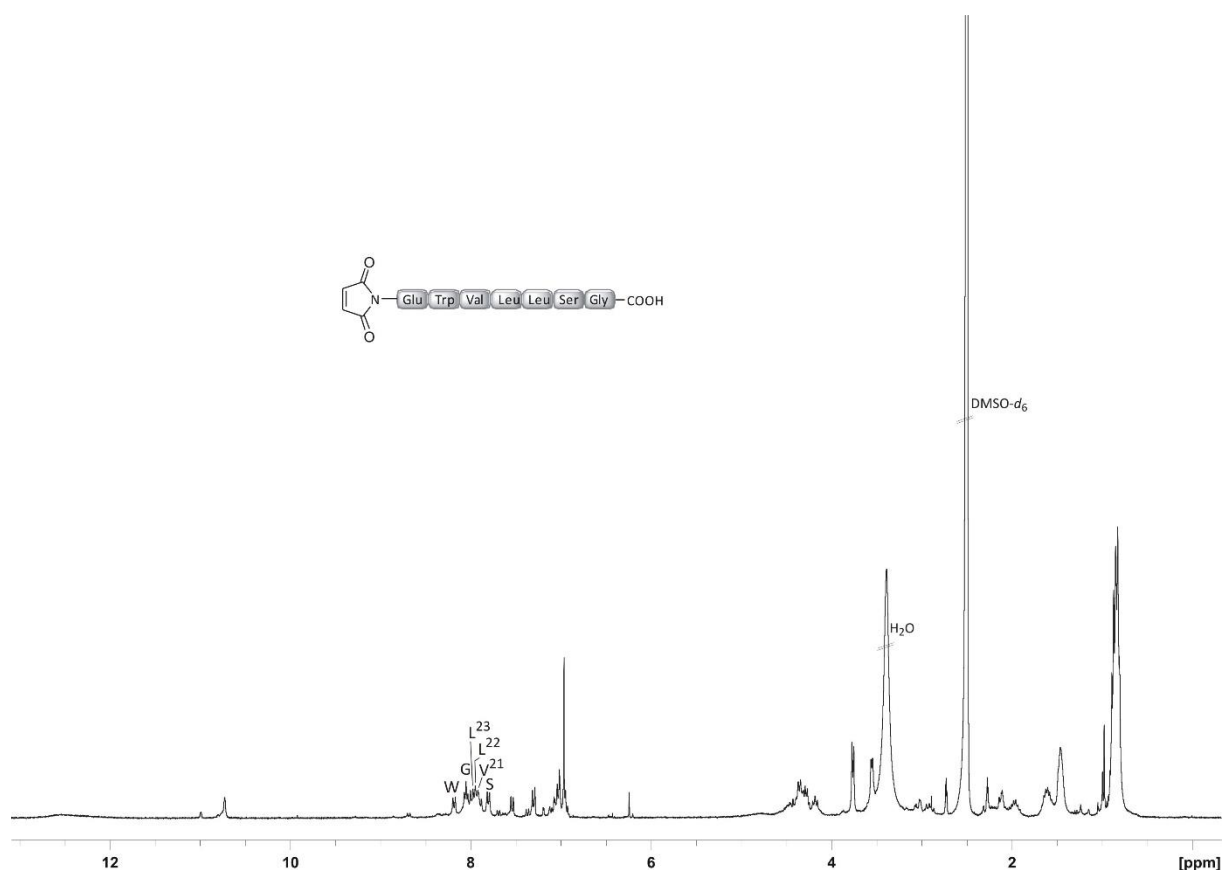
6.5.17 MalEWVLLSG (SLD403)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 7.75$ min, 10-80% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₄₂H₅₈N₈O₁₃]⁺ (M+Na); ber.: 905.4016; gef.: 905.4018.

NMR: 300 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆.



Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Mal	-			DoBi	6.96
19	Glu	-	4.44	2.10	H _γ	2.22
20	Trp	8.18	4.49	3.03; 2.92	2-H	7.01
					4-H	7.30
					5-H	7.05
					6-H	6.95
					7-H	7.54
					NH _ε	10.72
21	Val	7.88	4.18	1.96	H _γ	0.83
22	Leu	7.93	4.36	1.60	H _γ	1.45
					H _δ	0.85
23	Leu	7.98	4.35	1.60	H _γ	1.45
					H _δ	0.83
24	Ser	7.80	4.28	3.55		
<i>C</i> -term	Gly	8.05	3.76			

6.6 Synthese der zyklischen Hexapeptide

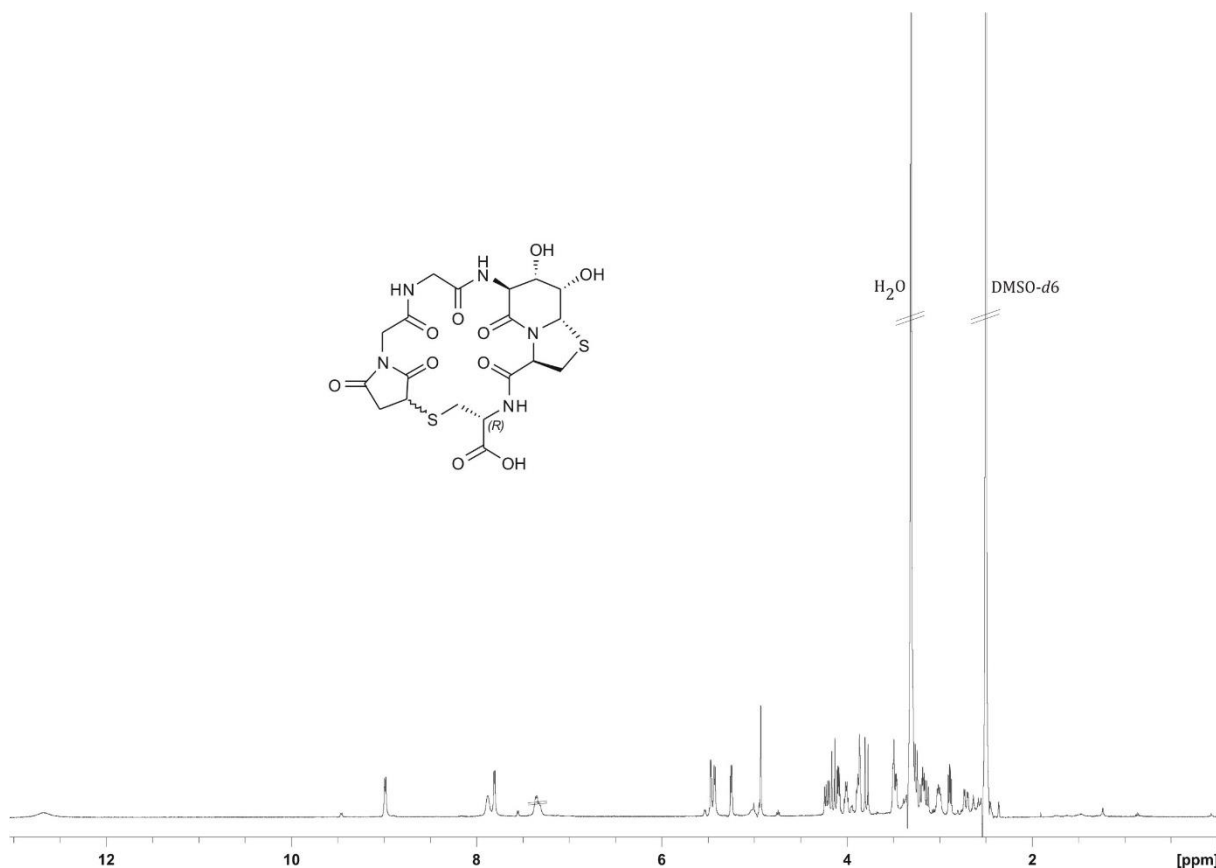
6.6.1 zylo[Suc=Gly-Gly-Hot=Tap-Cys] (93-DS1) (SLM057DS1/SLD237DS1)

Das lineare vorläufer Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des linearen Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das lineare Hexapeptid wurde ohne weitere Aufreinigung in 100 mL *n*-Butanol gelöst und für 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Diastereomere wurden mittels präparativer HPLC voneinander getrennt.

HPLC: $t_s = 5.03$ min, 10-60% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₁₉H₂₃N₅O₁₀S₂]⁺ (M+Na); ber.: 568.0779; gef.: 568.0781.

¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆;



Experimenteller Teil

	$\delta/{}^1\text{H}$	3J	2J	$\Delta\delta$	$\delta/{}^{13}\text{C}$	ppb/K
Hot=Tap						
8a-H	4.93	d, 1.5			62.5	
8-H	3.86	m			68.4	
7-H	3.88	m			69.8	
6-H	3.49	m			55.6	
3-H	5.25	dd, 6.9, 1.9			61.0	
2-H	3.25; 2.89	dd, dd, 6.7, 1.9	10.6	0.26	28.8	
7-OH	5.47	d, 4.4				
8-OH	5.43	d, 6.0				
NH	8.99	d, 6.9				-6.4
Glycin						
H_α	4.22; 3.48	dd, m, 8.0	17.3	0.74	40.3	
NH	7.87	bs				-3.6
Cystein						
H_α	4.01	ddd, 8.9, 6.3, 5.7			53.2	
H_β	3.18; 3.01	dd, dd, 8.9, 6.2	12.9	0.17	29.4	
NH	7.81	d, 5.6				-1.6
Succinimid						
H_α	4.09	dd, 9.3, 5.3			40.8	
H_β	3.15; 2.71	dd, dd, 9.4, 5.0	18.1	0.44	36.3	
Glycin						
H_α	4.15; 3.79		16.1	0.36	41.5	

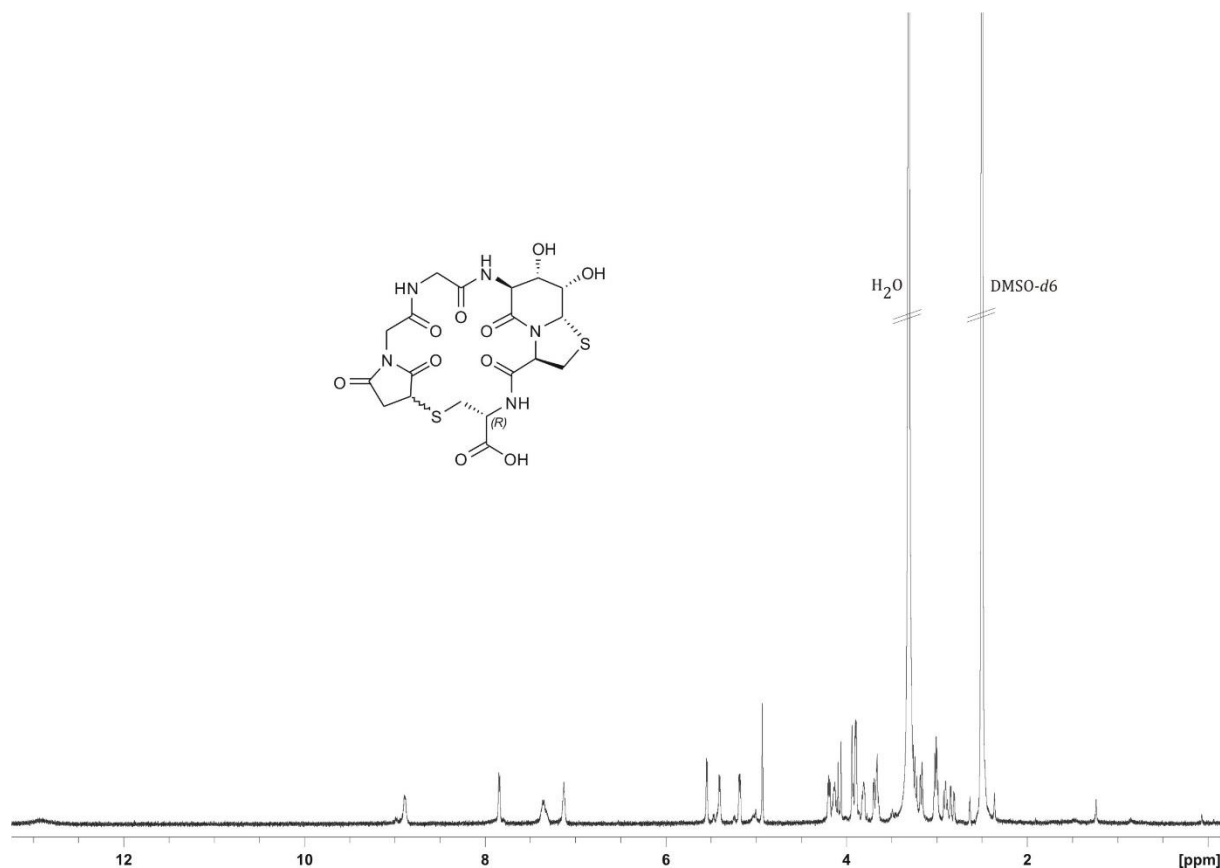
6.6.2 zylo[Suc=Gly-Gly-Hot=Tap-Cys] (93-DS2), (SLM057DS2/SLD237DS2)

Das lineare vorläufer Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des linearen Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das lineare Hexapeptid wurde ohne weitere Aufreinigung in 100 mL *n*-Butanol gelöst und für 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Diastereomere wurden mittels präparativer HPLC voneinander getrennt.

HPLC: $t_s = 6.28$ min, 10-60% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₁₉H₂₃N₅O₁₀S₂]⁺ (M+Na); ber.: 568.0779; gef.: 568.0780.

¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆;



Experimenteller Teil

	$\delta/{}^1\text{H}$	3J	2J	$\Delta\delta$	$\delta/{}^{13}\text{C}$	ppb/K
Hot=Tap						
8a-H	4.93	d, 1.9			63.5	
8-H	3.82	m			68.2	
7-H	3.90	m			70.3	
6-H	3.66	m			54.5	
3-H	5.18	dd, 6.7, 2.6			61.2	
2-H	3.17; 3.01	m, dd, 3.0	10.9	0.15	29.5	
7-OH	5.55	d, 4.9				
8-OH	5.40	d, 6.4				
NH	8.89	bs				-5.7
Glycin						
H_α	3.91; 3.68	m, dd, 4.3	17.0	0.23	41.4	
NH	7.13	bs				-1.0
Cystein						
H_α	4.14	m			52.9	
H_β	3.02; 2.90	m, m		0.12	28.8	
NH	7.84	d, 6.0				-1.7
Succinimid						
H_α	4.19	dd, 9.2, 4.3			39.8	
H_β	3.24; 2.82	dd, dd, 9.3, 3.9	18.6	0.42	35.2	
Glycin						
H_α	4.07; 3.92		15.8	0.15	41.8	

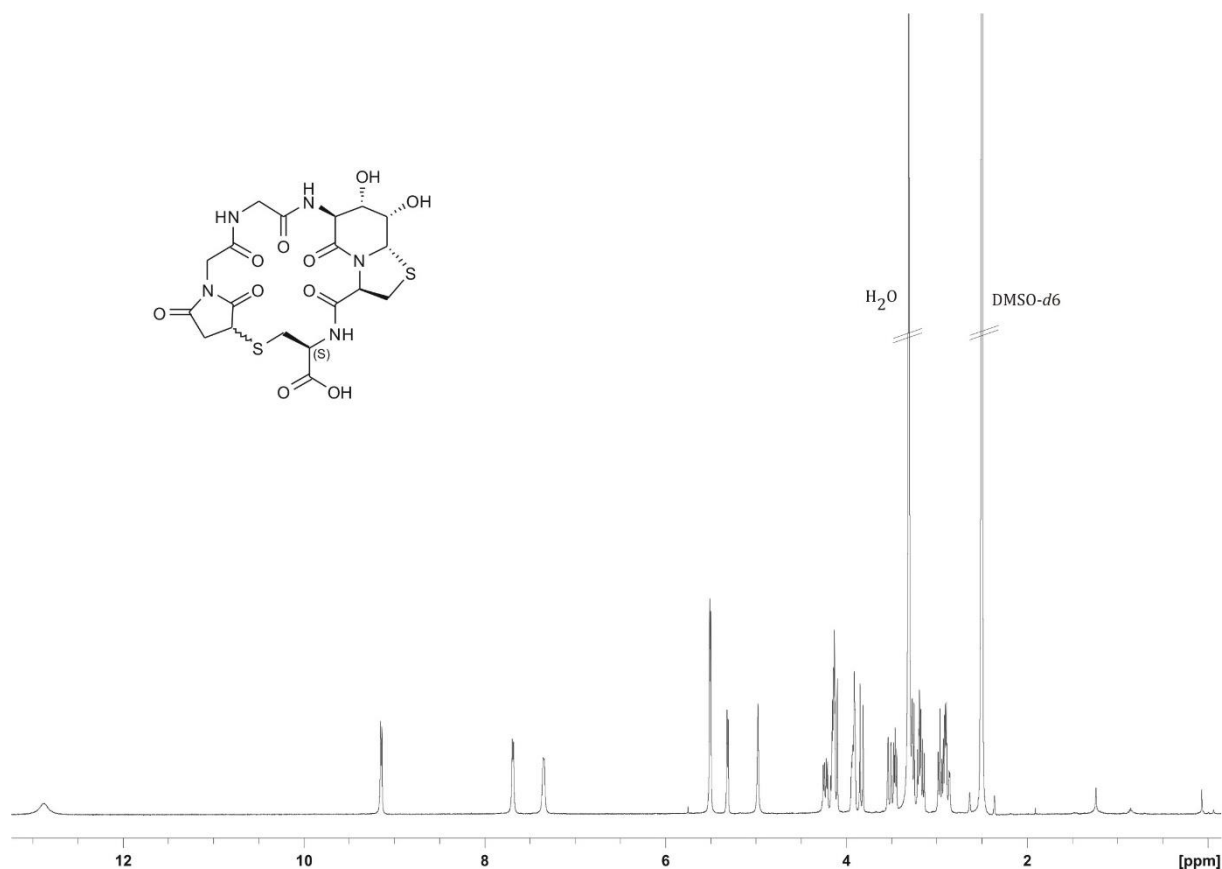
6.6.3 zylo[Suc=Gly-Gly-Hot=Tap-cys] (94-DS1), (SLM056DS1/MK119DS1)

Das lineare vorläufer Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des linearen Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das lineare Hexapeptid wurde ohne weitere Aufreinigung in 100 mL *n*-Butanol gelöst und für 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Diastereomere wurden mittels präparativer HPLC voneinander getrennt.

HPLC: t_s = 4.88 min, 10-60% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C_{18} 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{19}H_{23}N_5O_{10}S_2]^+$ (M+Na); ber.: 568.0779; gef.: 568.0777.

1H -NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO- d_6 ;



Experimenteller Teil

	$\delta/{}^1\text{H}$	3J	2J	$\Delta\delta$	$\delta/{}^{13}\text{C}$	ppb/K
Hot=Tap						
8a-H	4.97	s			62.6	
8-H	3.91	m			68.6	
7-H	3.94	m			69.9	
6-H	3.46	dd, 8.9, 6.9			55.4	
3-H	5.31	dd, 6.8, 1.8			61.7	
2-H	3.26; 2.91	dd, dd 6.8, 1.4	10.5	0.35	29.9	
7-OH	5.50	d, 4.8				
8-OH	5.50	d, 4.8				
NH	9.14	d, 6.9				-3.6
Glycin						
H_α	4.23; 3.52	dd, dd, 7.3, 2.1	17.6	0.71	41.2	
NH	7.35	t, 5.3				-5.0
Cystein						
H_α	4.15	m			52.9	
H_β	3.19; 2.95	dd, dd, 10.4, 7.1	10.7	0.24	28.4	
NH	7.68	d, 6.8				-1.6
Succinimid						
H_α	4.14	m			40.6	
H_β	3.16; 2.88	dd, dd, 9.0, 4.4	18.0	0.28	36.8	
Glycin						
H_α	4.13; 3.83		16.3	0.30	41.9	

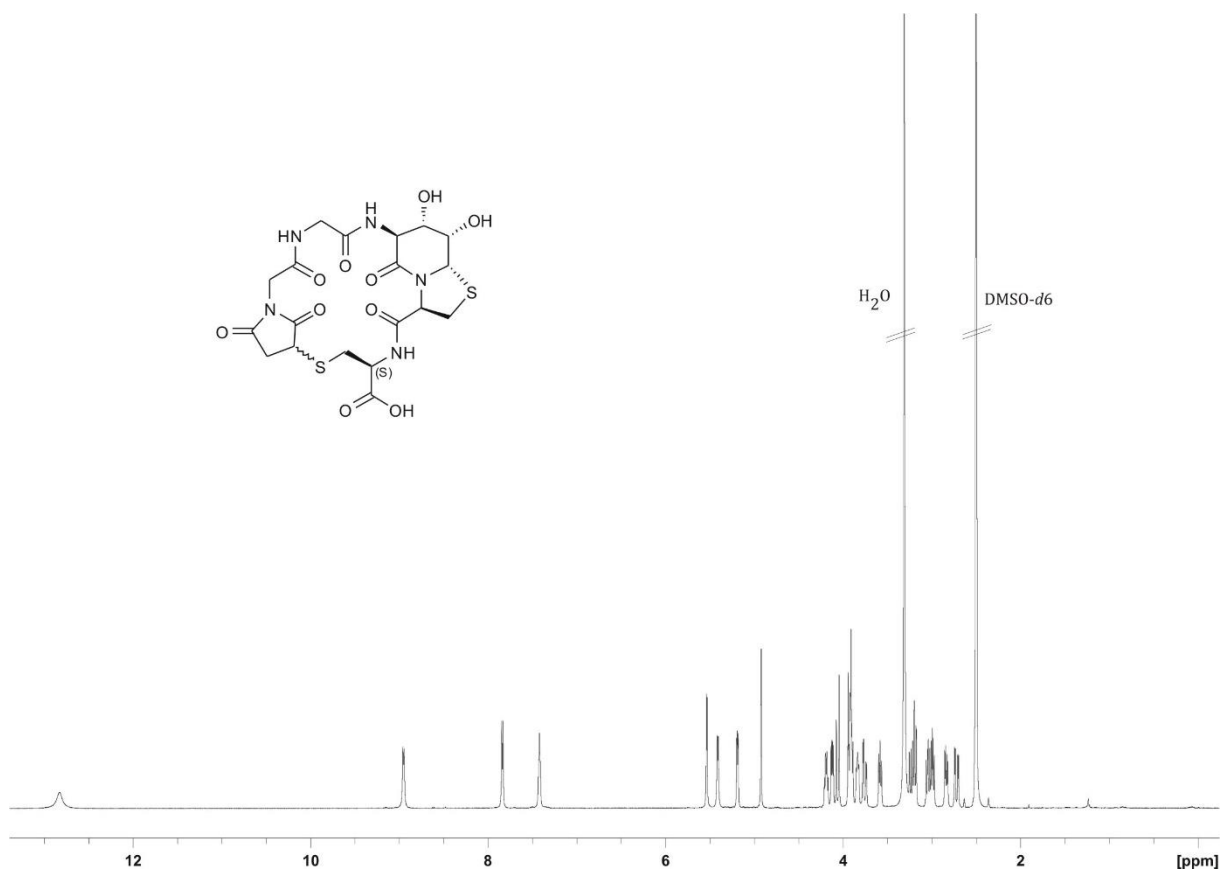
6.6.4 zylo[Suc=Gly-Gly-Hot=Tap-cys] (94-DS2), (SLM056DS2, MK119DS2)

Das lineare vorläufer Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des linearen Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das lineare Hexapeptid wurde ohne weitere Aufreinigung in 100 mL *n*-Butanol gelöst und für 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Diastereomere wurden mittels präparativer HPLC voneinander getrennt.

HPLC: t_s = 5.57 min, 10-60% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C_{18} 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{19}H_{23}N_5O_{10}S_2]^+$ (M+Na); ber.: 568.0779; gef.: 568.0776.

1H -NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO- d_6 ;



	$\delta/{}^1\text{H}$	3J	2J	$\Delta\delta$	$\delta/{}^{13}\text{C}$	ppb/K
Hot=Tap						
8a-H	4.92	d, 1.2			62.5	
8-H	3.92	m			68.4	
7-H	3.82	m			69.8	
6-H	3.58	dd, 8.9, 7.2			55.6	
3-H	5.19	dd, 6.7, 2.5			61.0	
2-H	3.18; 2.99	dd, dd, 6.8, 2.3	10.7	0.19	28.8	
7-OH	5.53	d, 6.1				
8-OH	5.41	d, 4.6				
NH	8.95	d, 6.7				-4.5
Glycin						
H_α	3.90; 3.76	m, dd, 4.2	17.3	0.14	40.3	
NH	7.42	t, 4.8				-4.0
Cystein						
H_α	4.19	ddd. 8.7, 6.6, 5.7			53.2	
H_β	3.04, 2.84	dd, dd, 8.8, 5.6	12.1	0.20	29.4	
NH	7.83	d. 6.8				-2.3
Succinimid						
H_α	4.12	dd, 9.3, 4.6			40.8	
H_β	3.22; 2.72	dd, dd, 9.3, 4.6	18.4	0.50	36.3	
Glycin						
H_α	4.06; 3.92		15.9	0.14	41.5	

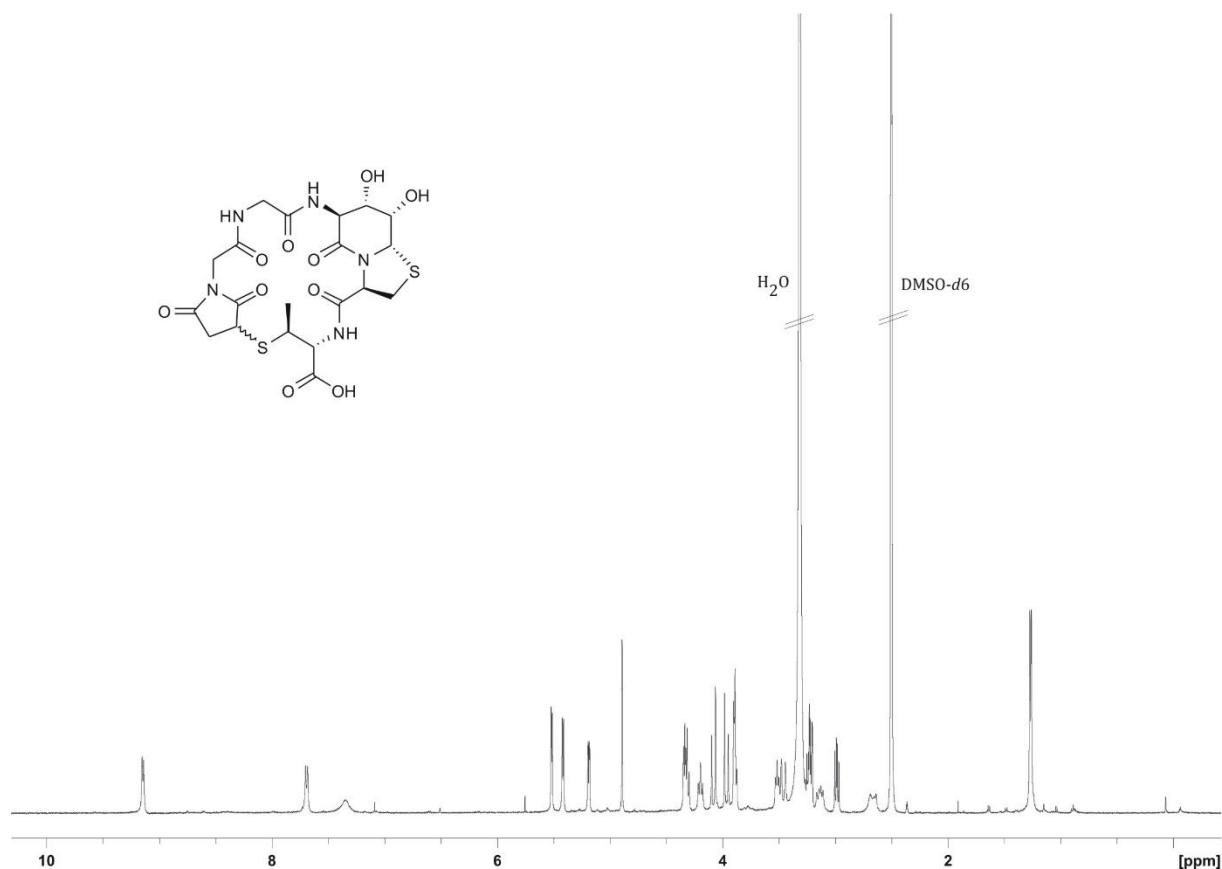
6.6.5 zyκλο[Suc=Gly-Gly-Hot=Tap-Tht] (95-DS1), (TvK066DS1)

Das lineare vorläufer Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des linearen Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das lineare Hexapeptid wurde ohne weitere Aufreinigung in 100 mL *n*-Butanol gelöst und für 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Diastereomere wurden mittels präparativer HPLC voneinander getrennt.

HPLC: $t_s = 3.86$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C_{18} 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{20}H_{25}N_5O_{10}S_2]^+$ (M+Na); ber.: 582.0935; gef.: 582.0940.

1H -NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO- d_6 ;



Experimenteller Teil

	$\delta/{}^1\text{H}$	3J	2J	$\Delta\delta$	$\delta/{}^{13}\text{C}$	ppb/K
Hot=Tap						
8a-H	4.89	s			63.1	
8-H	3.89	m			68.7	
7-H	3.88	m			70.2	
6-H	3.51	dd, 7.3, 8.6			55.3	
3-H	5.19	dd, 6.7, 2.4			61.9	
2-H	3.24; 2.98	m, dd, 6.9	10.7	0.26	29.4	
7-OH	5.41	d, 6.3				
8-OH	5.51	d, 4.7				
NH	9.14	d, 7.3				-5.8
Glycin						
H_α	4.34; 3.46	dd, dd, 8.4, 3.4	17.8	0.88	40.4	
NH	7.32	bs				-2.2
L-allo-Thiothreonin						
H_α	4.19	dd, 10.3, 8.8			58.0	
H_β	3.24	dd, 10.3, 7.2			39.9	
H_γ	1.26	d, 7.2			19.3	
NH	7.69	d, 8.8				-1.4
Succinimid						
H_α	4.33	m			40.8	
H_β	3.12; 2.66	m, dd, 9.6	18.6	0.46	37.9	
Glycin						
H_α	3.96; 4.08	d	16.5	0.11	41.8	

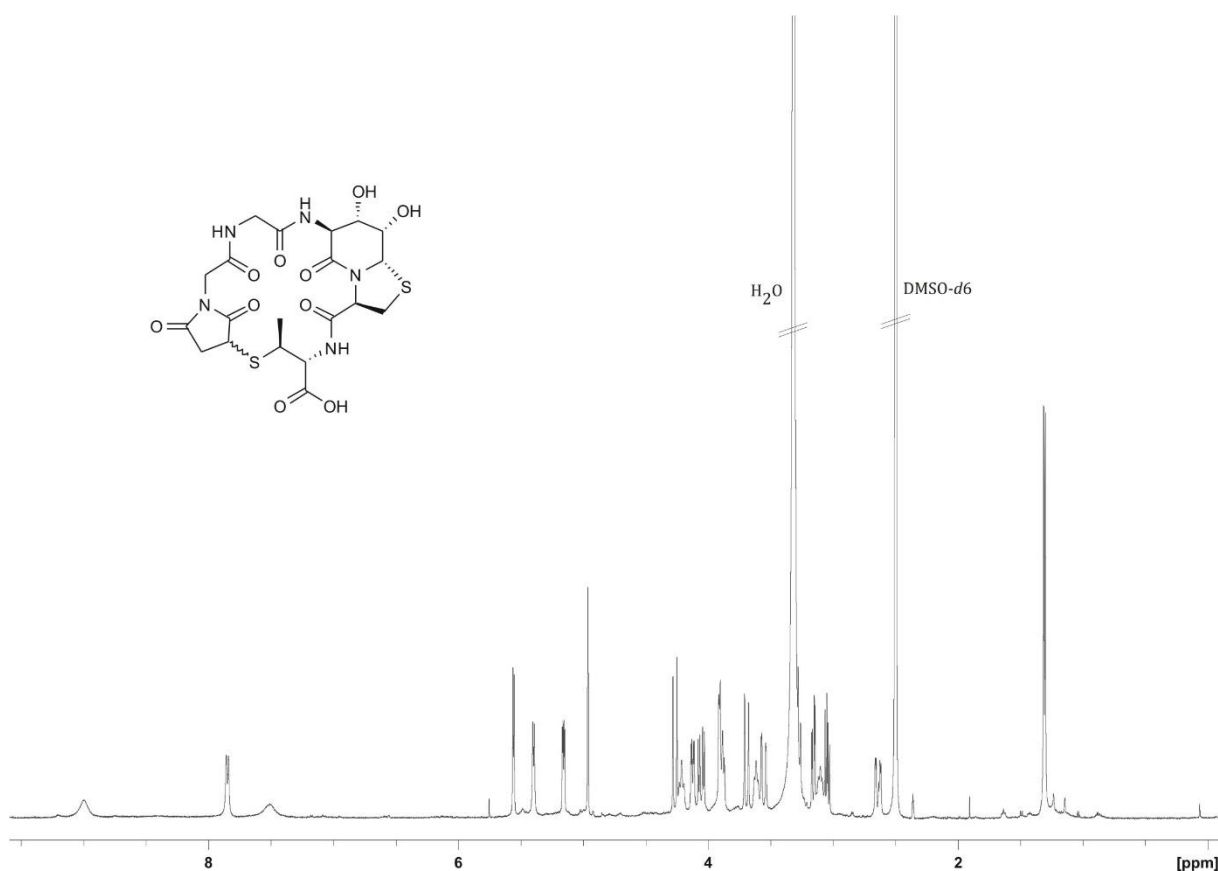
6.6.6 zylo[Suc=Gly-Gly-Hot=Tap-Tht] (95-DS2), (TvK066DS2)

Das lineare vorläufer Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des linearen Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das lineare Hexapeptid wurde ohne weitere Aufreinigung in 100 mL *n*-Butanol gelöst und für 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Diastereomere wurden mittels präparativer HPLC voneinander getrennt.

HPLC: $t_s = 4.58$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₂₀H₂₅N₅O₁₀S₂]⁺ (M+Na); ber.: 582.0935; gef.: 582.0938.

¹H-NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆;



Experimenteller Teil

	$\delta/{}^1\text{H}$	3J	2J	$\Delta\delta$	$\delta/{}^{13}\text{C}$	ppb/K
Hot=Tap						
8a-H	4.96	d, 1.1			64.3	
8-H	3.91	m			69.2	
7-H	3.88	m			70.9	
6-H	3.62	t, 7.5			55.7	
3-H	5.16	dd, 6.9, 3.1			62.5	
2-H	3.16; 3.05	dd, dd, 6.9, 3.1	10.9	0.11	30.4	
7-OH	5.40	d, 6.0				
8-OH	5.56	d, 4.7				
NH	9.01	bs				-7.4
Glycin						
H_α	4.06; 3.56	dd, dd, 6.6, 2.2	17.7	0.50	41.9	
NH	7.47	bs				-2.4
L-allo-Thiothreonin						
H_α	4.21	dd, 9.1, 8.9			58.0	
H_β	3.10	dd, 9.1, 7.0			38.5	
γH	1.31	d, 7.0			21.7	
NH	7.86	d, 8.9				-1.2
Succinimid						
H_α	4.13	dd, 9.6, 3.9			40.8	
H_β	3.30; 2.64	dd, dd, 9.7, 3.8	19.0	0.66	35.2	
Glycin						
H_α	4.27; 3.69		16.0	0.58	43.0	

Experimenteller Teil

	$\delta/{}^1\text{H}$	3J	2J	$\Delta\delta$	$\delta/{}^{13}\text{C}$	ppb/K
Hot=Tap						
8a-H	4.94	d, 1.3			62.9	
8-H	3.86	t, 2.0			68.3	
7-H	3.84	dd, 8.9, 2.0			69.9	
6-H	3.56	dd, 8.9, 7.2			54.9	
3-H	5.21	dd, 6.8, 2.2			61.3	
2-H	3.21; 2.92	dd, dd, 6.7, 2.9	10.5	0.29	29.1	
7-OH	5.49	bs				
8-OH	5.49	bs				
NH	8.98	d, 7.2				-
Glycin						
H_α	3.98; 3.64	dd, dd, 5.9, 4,3	17.4	0.34	41.0	
NH	7.19	t, 5.0				-
Cystein						
H_α	4.01	m			53.2	
H_β	3.05; 3.00	dd, dd, 8.6, 6.9	13.3	0.05	29.4	
NH	7.82	d, 6.4				-
Succinimid						
H_α	4.14	dd, 9.3, 4.1			40.5	
H_β	3.20; 2.53	dd, dd, 9.3, 4.1	18.3	0.67	35.7	
Alanin						
H_α	4.62	q, 7.3			49.4	
H_β	1.45	d, 7.3			13.1	

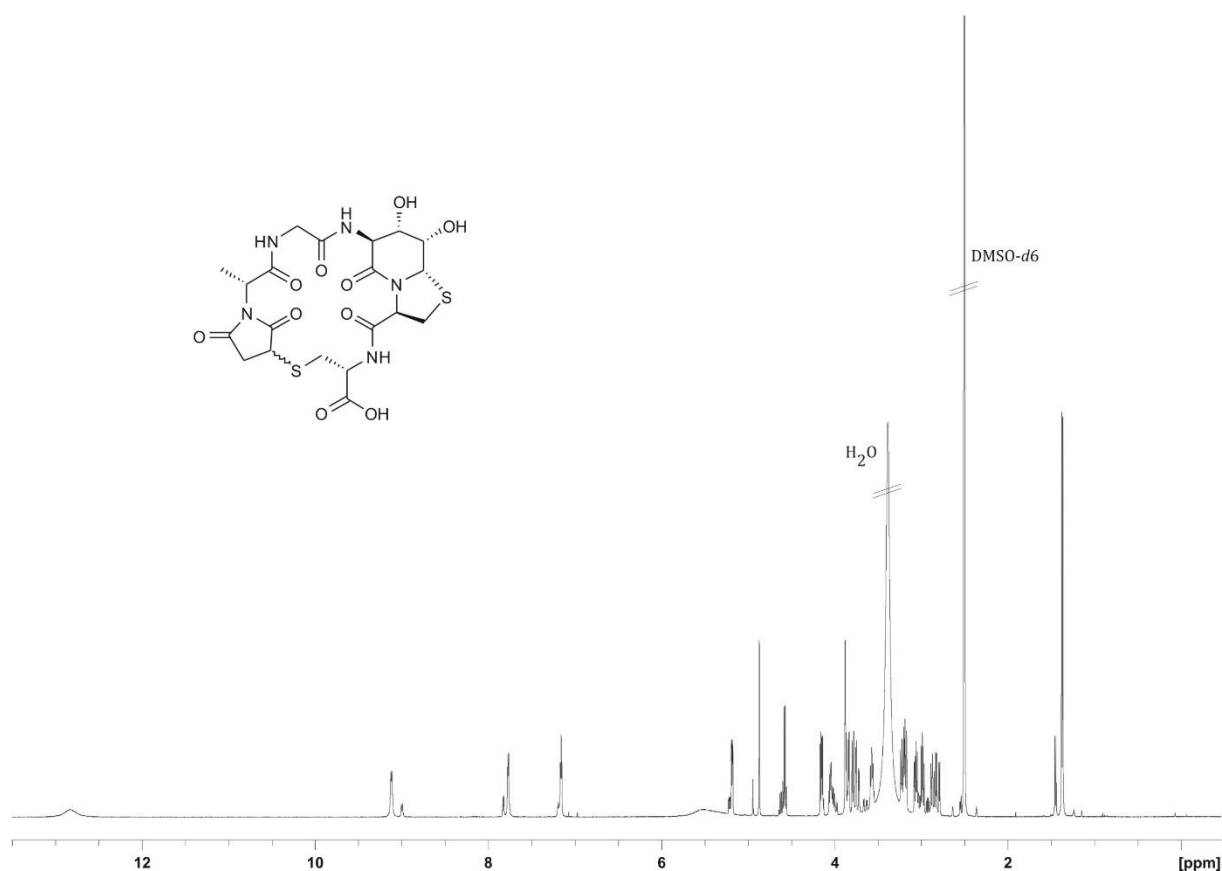
6.6.8 zyκλο[Suc=ala-Gly-Hot=Tap-Cys] (91-DS2), (AH36DS2)

Das lineare vorläufer Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des linearen Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das lineare Hexapeptid wurde ohne weitere Aufreinigung in 100 mL *n*-Butanol gelöst und für 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Diastereomere wurden mittels präparativer HPLC voneinander getrennt.

HPLC: $t_s = 3.79$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₂₀H₂₅N₅O₁₀S₂]⁺ (M+Na); ber.: 582.0935; gef.: 582.0939.

NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆.



	$\delta/{}^1\text{H}$	3J	2J	$\Delta\delta$	$\delta/{}^{13}\text{C}$	ppb/K
Hot=Tap						
8a-H	4.87	d, 1.8			63.3	
8-H	3.88	dd, 2.2, 1.8			68.4	
7-H	3.78	dd, 8.9, 2.2			70.5	
6-H	3.57	m			54.8	
3-H	5.18	dd, 6.7, 2.6			61.5	
2-H	3.17; 2.98	dd, dd, 6.4, 2.7	10.6	0.19	29.4	
7-OH	5.52	bs				
8-OH	5.52	bs				
NH	9.11	d, 6.5				
Glycin						
H_α	3.85; 3.73	dd, dd, 5.3, 3.6	16.7	0.12	42.0	
NH	7.16	t, 4.58				
Cystein						
H_α	4.04	ddd, 8.7, 6.4, 6.0			53.0	
H_β	3.06; 2.86	dd, dd, 8.7, 6.4	11.3	0.20	28.7	
NH	7.76	d, 6.0				
Succinimid						
H_α	4.15	dd, 9.3, 5.3			39.9	
H_β	3.21; 2.80	dd, dd, 9.3, 5.3	18.1	0.41	35.4	
Alanin						
H_α	4.57	q, 7.2			48.5	
H_β	1.37	d, 7.2			13.1	

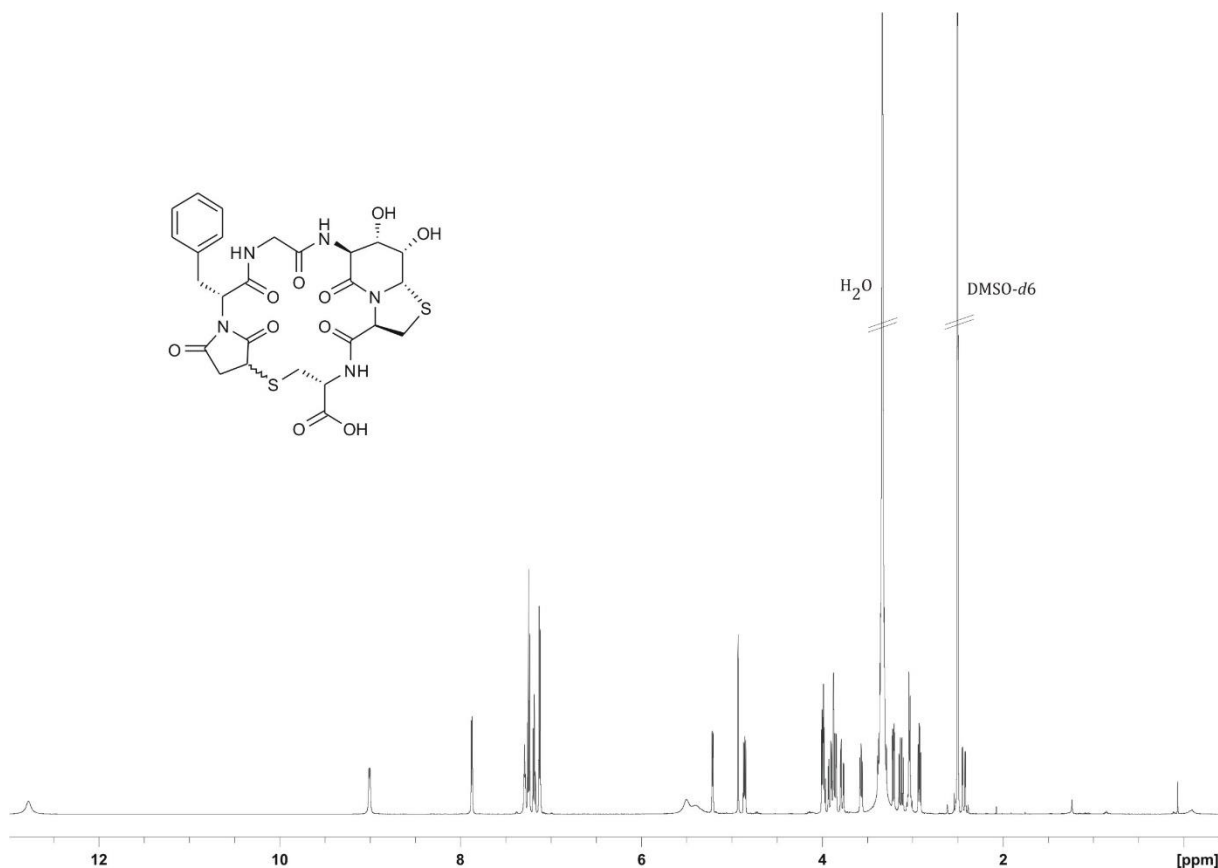
6.6.9 zyko[Suc=phe-Gly-Hot=Tap-Cys] (92-DS1), (SLD088DS1)

Das lineare vorläufer Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des linearen Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das lineare Hexapeptid wurde ohne weitere Aufreinigung in 100 mL *n*-Butanol gelöst und für 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Diastereomere wurden mittels präparativer HPLC voneinander getrennt.

HPLC: $t_s = 7.70$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C_{18} 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{26}H_{29}N_5O_{10}S_2]^+$ (M+Na); ber.: 658.1248; gef.: 658.1452.

NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO- d_6 .



Experimenteller Teil

	$\delta/{}^1\text{H}$	3J	2J	$\Delta\delta$	$\delta/{}^{13}\text{C}$	ppb/K
Hot=Tap						
8a-H	4.93	d, 1.8			62.9	
8-H	3.87	m			68.2	
7-H	3.85	dd, 9.0, 1.8			70.0	
6-H	3.57	dd, 8.8, 6.9			54.8	
3-H	5.21	dd, 6.8, 2.2			61.2	
2-H	3.21; 2.91	dd, dd, 6.8, 2.6	10.5	0.30	29.2	
7-OH	5.38	bs				
8-OH	5.49	bs				
NH	9.00	d, 7.9				-4.16
Glycin						
H_α	3.91; 3.77	dd, dd, 5.3, 4.9	17.3	0.14	41.1	
NH	7.28	t, 4.9				-3.50
Cystein						
H_α	3.98	m			53.3	
H_β	3.04; 3.02	dd, dd, 7.6, 7.2	13.5	0.02	29.7	
NH	7.87	d, 6.4				-1.33
Succinimid						
H_α	3.99	dd, 9.4, 3.9			39.9	
H_β	3.12; 2.43	dd, dd, 9.4, 3.9	18.7	0.69	35.3	
Phenylalanin						
H_α	4.86	dd, 10.5, 5.6			55.2	
H_β	3.37; 3.30	dd, dd, 10.9, 5.4	14.5	0.07	32.2	
Arom.	7.26-7.10	m			128.3-126.2	

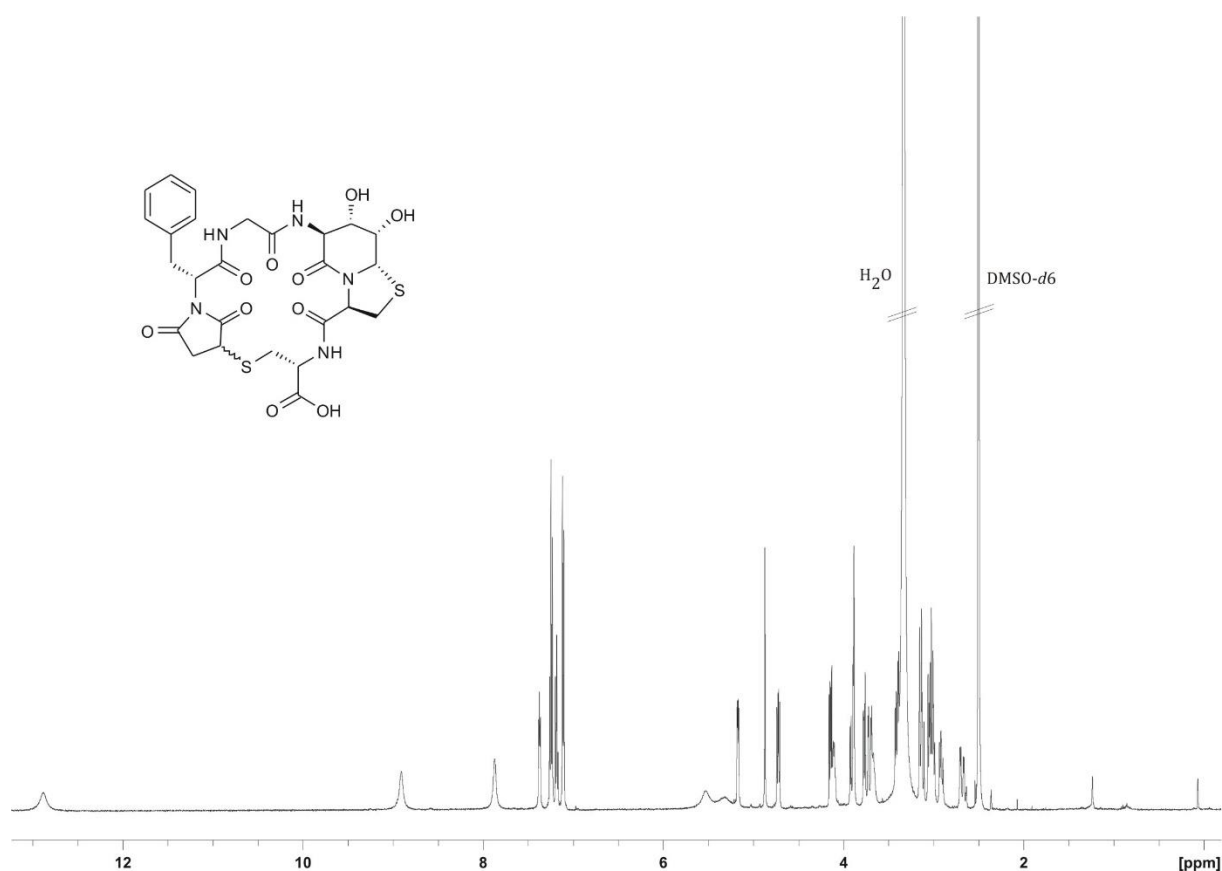
6.6.10 zyko[Suc=phe-Gly-Hot=Tap-Cys] (92-DS2), (SLD088DS2)

Das lineare vorläufer Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des linearen Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das lineare Hexapeptid wurde ohne weitere Aufreinigung in 100 mL *n*-Butanol gelöst und für 4 h unter Rückfluss gerührt. Nach Abkühlen auf RT wurde das Lösungsmittel abkondensiert und der Rückstand in dest. Wasser aufgenommen und lyophilisiert. Die Diastereomere wurden mittels präparativer HPLC voneinander getrennt.

HPLC: $t_s = 7.97$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₂₆H₂₉N₅O₁₀S₂]⁺ (M+Na); ber.: 658.1248; gef.: 658.1452.

NMR: 500 MHz, 300 K, DMSO-*d*₆.



Experimenteller Teil

	$\delta/{}^1\text{H}$	3J	2J	$\Delta\delta$	$\delta/{}^{13}\text{C}$	ppb/K
Hot=Tap						
8a-H	4.87	d, 1.8			63.4	
8-H	3.88	m			68.2	
7-H	3.77	dd, 9.2, 1.8			70.6	
6-H	3.66	m			54.3	
3-H	5.17	dd, 6.8, 2.9			61.2	
2-H	3.14; 3.00	dd, dd, 6.8, 2.3	10.5	0.14	29.0	
7-OH	5.54	bs				
8-OH	5.29	bs				
NH	8.90	bs				-5.33
Glycin						
H_α	3.90; 3.70	dd, dd, 6.3, 3.8	16.6	0.20	42.0	
NH	7.37	dd, 6.1, 3.8				-3.50
Cystein						
H_α	4.10	m			53.0	
H_β	3.04; 2.91	dd, dd, 8.1, 6.6	11.6	0.13	29.2	
NH	7.87	bs				-1.66
Succinimid						
H_α	4.14	dd, 9.2, 5.5			39.6	
H_β	3.03; 2.68	dd, dd, 9.2, 5.5	18.5	0.35	35.0	
Phenylalanin						
H_α	4.72	dd, 9.9, 6.2			54.8	
H_β	3.40; 3.12	dd, dd, 9.9, 6.2	14.0	0.28	32.4	
Arom.	7.27-7.08	m			128.5-126.2	

6.7 Festphasensynthese der isolierten β -hairpin Peptide des Foldons

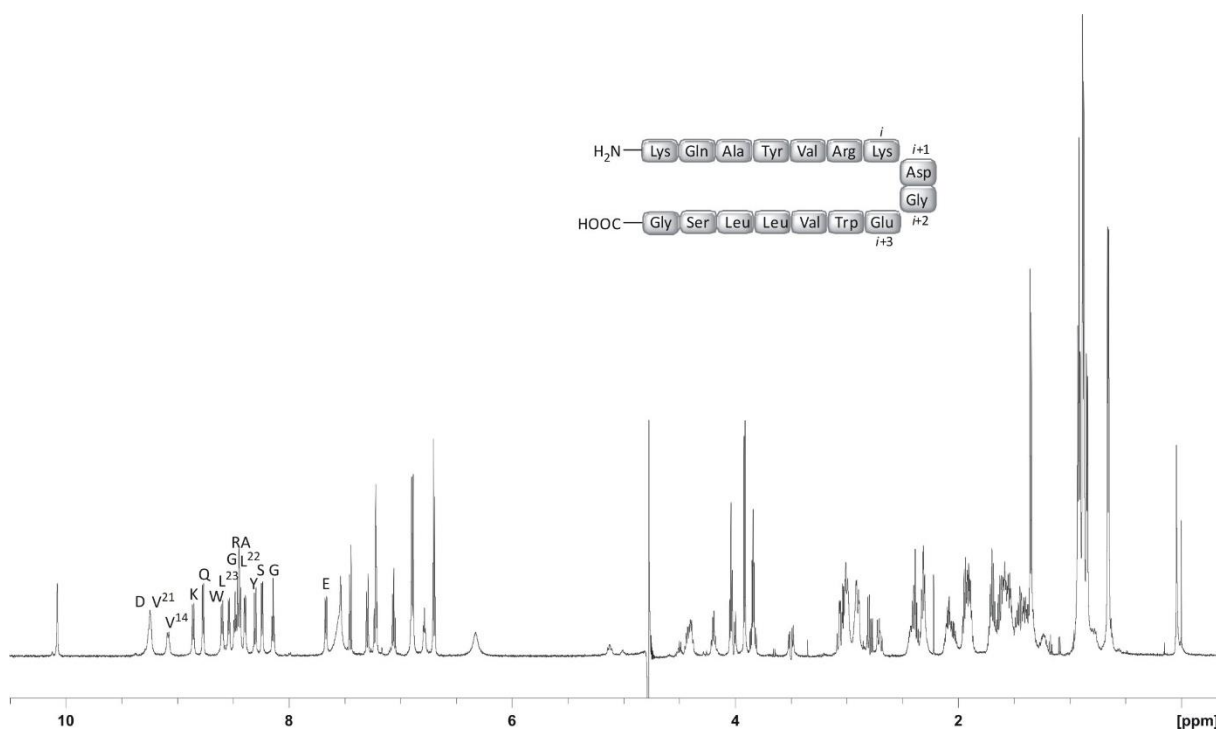
6.7.1 KQAYVRKDGWVLLSG (96), (SLD181)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 7.35$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₄H₁₃₃N₂₃O₂₄]²⁺ (M+2H); ber.: 925.0020; gef.: 925.0007.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H _α	H _β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.04	1.90	H _γ	1.44
					H _δ	1.70
					H _ε	2.99
11	Gln	8.77	4.44	1.94	H _γ	2.31
12	Ala	8.45	4.50	1.37		
13	Tyr	8.30	5.12	2.91; 2.68	2,6-H	6.89
					3,5-H	6.69
14	Val	9.08	4.60	2.04	H _γ	0.89
15	Arg	8.45	4.43	1.48; 0.78	H _γ	0.93
					H _δ	2.44; 2.31
					NH _ε	6.78
16	Lys	8.85	4.40	1.70; 1.58	H _γ	1.34; 1.23
					H _δ	1.62
					H _ε	2.91
17	Asp	9.23	4.39	3.04; 2.79		
18	Gly	8.48	4.01; 3.50			
19	Glu	7.67	4.58	2.09; 1.90	H _γ	2.39
20	Trp	8.59	5.01	3.04; 2.98	2-H	7.22
					4-H	7.29
					5-H	7.22
					6-H	7.06
					7-H	7.45
					NH _ε	10.07
21	Val	9.25	4.52	2.09	H _γ	0.92
22	Leu	8.39	4.20	1.54; 1.39	H _γ	1.36
					H _δ	0.64; 0.62
23	Leu	8.54	4.40	1.56; 1.45	H _γ	1.56
					H _δ	0.86
24	Ser	8.24	4.49	3.84		
<i>C</i> -term	Gly	8.14	3.92			

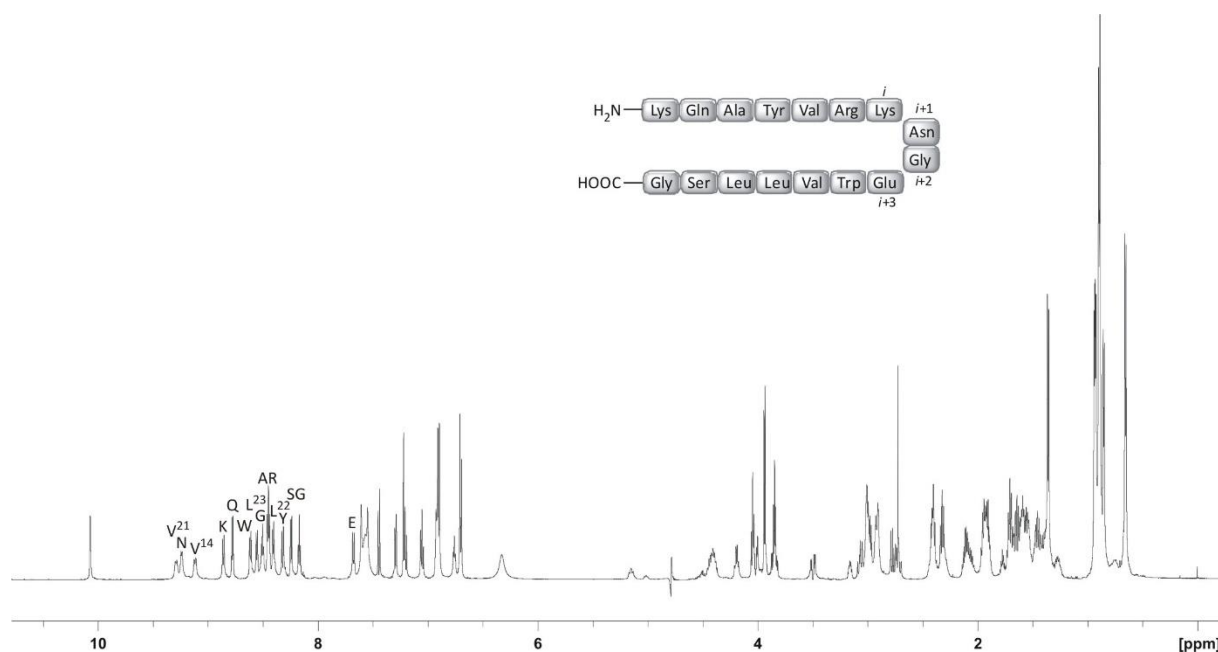
6.7.2 KQAYVRKNGEWVLLSG (97), (AH46)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 7.49$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₄H₁₃₄N₂₄O₂₃]²⁺ (M+2H); ber.: 924.5100; gef.: 924.5102.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Experimenteller Teil

Position	Aminosäure	NH	H _α	H _β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.04	1.90	H _γ	1.45
					H _δ	1.69; 1.64
					H _ε	3.00
11	Gln	8.77	4.44	1.95	H _γ	2.32
12	Ala	8.46	4.51	1.36		
13	Tyr	8.32	5.14	2.91; 2.72	2,6-H	6.90
					3,5-H	6.69
14	Val	9.12	4.62	2.06	H _γ	0.91
15	Arg	8.44	4.46	1.48; 0.75	H _γ	0.89
					H _δ	2.42; 2.30
16	Lys	8.86	4.41	1.61	H _γ	1.36; 1.27
					H _δ	1.71; 1.58
					H _ε	2.91
17	Asn	9.24	4.39	2.98; 2.77	NH _γ	6.32
18	Gly	8.50	4.01; 3.50			
19	Glu	7.67	4.60	2.11; 1.91	H _γ	2.39
20	Trp	8.61	5.01	3.07; 3.01	2-H	7.22
					4-H	7.29
					5-H	7.20
					6-H	7.06
					7-H	7.44
					NH _ε	10.07
21	Val	9.29	4.53	2.11	H _γ	0.91
22	Leu	8.41	4.19	1.55; 1.38	H _γ	1.37
					H _δ	0.66
23	Leu	8.55	4.41	1.57	H _γ	1.58
					H _δ	0.87
24	Ser	8.24	4.51	3.85		
<i>C</i> -term	Gly	8.17	3.94			

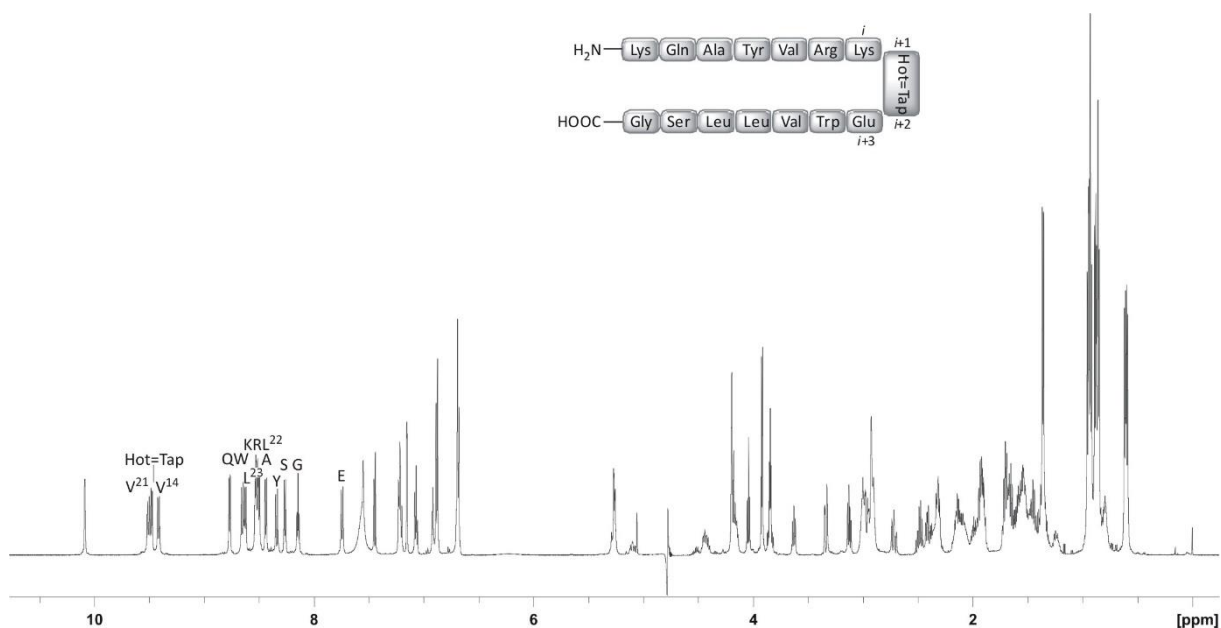
6.7.3 KQAYVRKΨEWVLLSG (98), (Ψ = Hot=Tap), (AH33)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 6.60$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C_{18} 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{86}H_{135}N_{23}O_{24}S]^{2+}$ (M+2H); ber.: 953.9958; gef.: 953.9951.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.04	1.91	H _γ	1.44
					H _δ	1.70
					H _ε	2.99
11	Gln	8.76	4.46	1.94	H _γ	2.31
12	Ala	8.43	4.55	1.36		
13	Tyr	8.34	5.28	2.92; 2.71	2,6-H	6.88
					3,5-H	6.68
14	Val	9.41	4.73	2.10	H _γ	0.93
15	Arg	8.52	4.16	1.47; 0.78	H _γ	0.95
					H _δ	2.36; 2.08
					NH _ε	6.69
16	Lys	8.53	4.46	1.65	H _γ	1.35; 1.23
					H _δ	1.68; 1.55
					H _ε	2.92
17	Hot	9.48			6-H	3.63
					7-H	4.19
					8-H	4.19
					8a-H	5.06
18	Tap	-			3-H	5.26
					2-H	3.33; 3.13
19	Glu	7.74	4.76	2.15; 1.98	H _γ	2.48; 2.41
20	Trp	8.65	5.09	2.98; 2.92	2-H	7.15
					4-H	7.22
					5-H	7.21
					6-H	7.06
					7-H	7.44
					NH _ε	10.08
21	Val	9.50	4.64	2.13	H _γ	0.93; 0.86
22	Leu	8.50	4.19	1.54; 1.35	H _γ	1.36
					H _δ	0.61; 0.59
23	Leu	8.62	4.41	1.59; 1.52	H _γ	1.57
					H _δ	0.88; 0.85
24	Ser	8.26	4.51	3.84		
<i>C</i> -term	Gly	8.14	3.92			

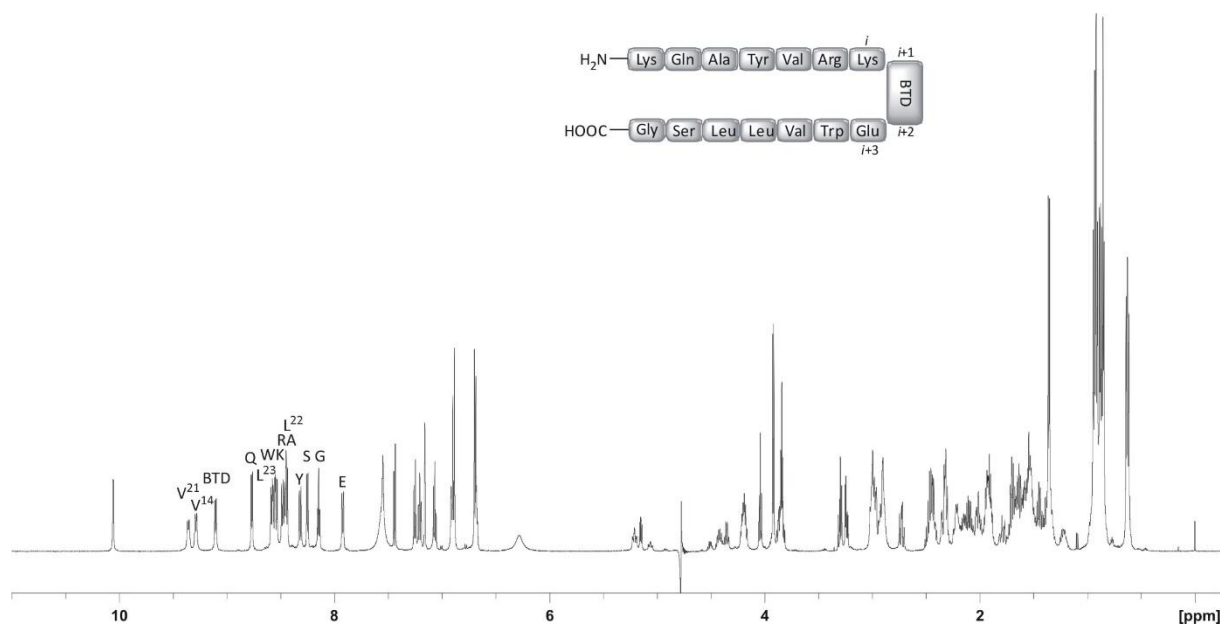
6.7.4 KQAYVRKEEWVLLSG (99), (Ξ = BTD), (AH34)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: t_s = 7.77 min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₆H₁₃₅N₂₃O₂₂S]²⁺ (M+2H); ber.: 938.0009; gef.: 937.9998.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Experimenteller Teil

Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.04	1.91	H _γ	1.46
					H _δ	1.71
					H _ε	3.00
11	Gln	8.76	4.44	1.95	H _γ	2.32
12	Ala	8.44	4.52	1.35		
13	Tyr	8.31	5.21	2.92; 2.72	2,6-H	6.89
					3,5-H	6.69
14	Val	9.28	4.69	2.09	H _γ	0.93
15	Arg	8.48	4.19	1.51; 0.93	H _γ	0.94
					H _δ	2.46; 2.21
16	Lys	8.54	4.37	1.66	H _γ	1.35; 1.22
					H _δ	1.54
					H _ε	2.91
17/18	BTD	9.10			2-H	2.35; 1.78
					3-H	4.93
					6-H	3.87
					7-H	2.23; 2.03
					8-H	4.67
					8a-H	*
19	Glu	7.92	4.69	2.16; 2.01	H _γ	2.46
20	Trp	8.56	5.07	3.00; 2.97	2-H	7.14
					4-H	7.25
					5-H	7.20
					6-H	7.06
					7-H	7.44
					NH _ε	10.05
21	Val	9.35	4.60	2.11	H _γ	0.94; 0.86
22	Leu	8.45	4.21	1.55; 1.38	H _γ	1.35
					H _δ	0.63; 0.61
23	Leu	8.58	4.41	1.63	H _γ	1.56
					H _δ	0.88; 0.85
24	Ser	8.25	4.50	3.85		
<i>C</i> -term	Gly	8.14	3.92			

* nicht Bestimmbar

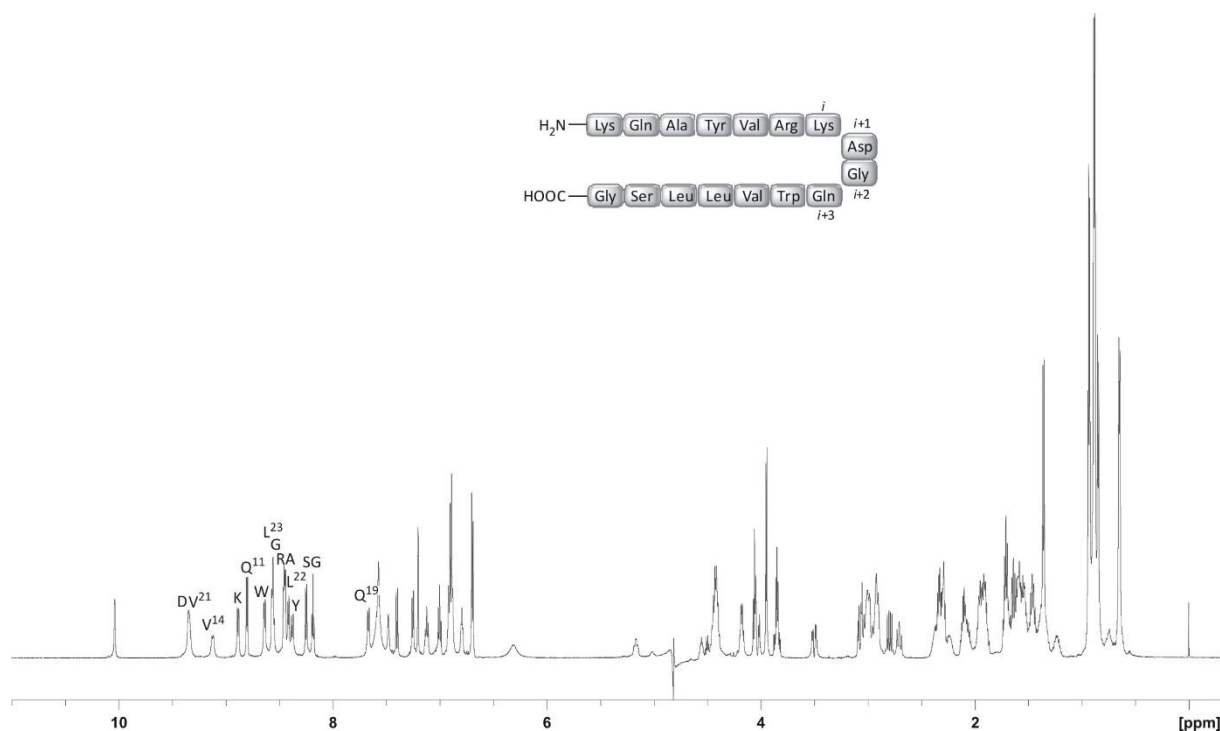
6.7.5 KQAYVRKDGQWVLLSG (100), (SLD299)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.06$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C₁₈ 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₄H₁₃₄N₂₄O₂₃]³⁺ (M+3H); ber.: 616.6757; gef.: 616.6840.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.06	1.89	H _γ	1.45
					H _δ	1.70
					H _ε	2.99
11	Gln	8.80	4.43	1.94	H _γ	2.31
12	Ala	8.44	4.54	1.35		
13	Tyr	8.37	5.15	2.90; 2.69	2,6-H	6.89
					3,5-H	6.69
14	Val	9.12	4.64	2.05	H _γ	0.89
15	Arg	8.45	4.45	1.47; 0.74	H _γ	0.90
					H _δ	2.36; 2.22
16	Lys	8.88	4.40	1.70	H _γ	1.33; 1.21
					H _δ	1.61
					H _ε	2.91
17	Asp	9.34	4.40	3.06; 2.78		
18	Gly	8.54	4.03; 3.49			
19	Gln	7.66	4.54	2.10; 1.89	H _γ	2.29
20	Trp	8.63	4.99	3.04; 2.97	2-H	7.20
					4-H	7.25
					5-H	7.12
					6-H	7.00
					7-H	7.39
					NH _ε	10.03
21	Val	9.33	4.54	2.08	H _γ	0.89
22	Leu	8.41	4.17	1.53; 1.37	H _γ	1.36
					H _δ	0.65
23	Leu	8.56	4.40	1.56	H _γ	1.55
					H _δ	0.86
24	Ser	8.25	4.49	3.84		
<i>C</i> -term	Gly	8.18	3.93			

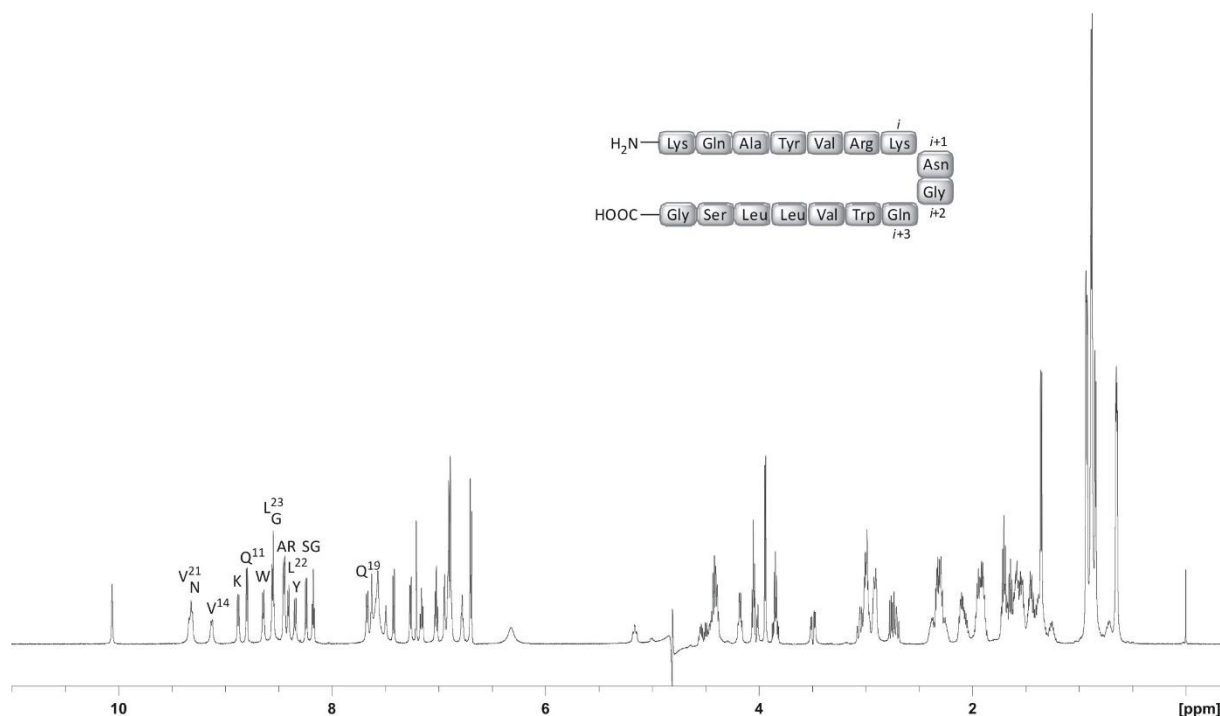
6.7.6 KQAYVRKNGQWVLLSG (101), (SLD297)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.07$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C_{18} 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{84}H_{135}N_{25}O_{22}]^{2+}$ (M+2H); ber.: 924.0180; gef.: 924.0188.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Experimenteller Teil

Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.05	1.90	H _γ	1.45
					H _δ	1.71
					H _ε	3.00
11	Gln	8.79	4.44	1.95	H _γ	2.32
12	Ala	8.45	4.53	1.35		
13	Tyr	8.34	5.16	2.91; 2.72	2,6-H	6.89
					3,5-H	6.69
14	Val	9.12	4.65	2.06	H _γ	0.91
15	Arg	8.44	4.44	1.45; 0.72	H _γ	0.89
					H _δ	2.39; 2.25
					NH _ε	6.78
16	Lys	8.87	4.44	1.71	H _γ	1.36; 1.27
					H _δ	1.64
					H _ε	2.91
17	Asn	9.30	4.39	3.00; 2.77	NH _γ	*
18	Gly	8.54	4.04; 3.49			
19	Gln	7.67	4.55	2.11; 1.90	H _γ	2.30
20	Trp	8.64	5.00	3.05; 2.98	2-H	7.20
					4-H	7.26
					5-H	7.16
					6-H	7.02
					7-H	7.42
					NH _ε	10.06
21	Val	9.32	4.56	2.11	H _γ	0.91
22	Leu	8.46	4.18	1.55; 1.38	H _γ	1.38
					H _δ	0.65
23	Leu	8.55	4.40	1.57	H _γ	1.57
					H _δ	0.87
24	Ser	8.24	4.51	3.85		
<i>C</i> -term	Gly	8.17	3.94			

* Nicht Bestimmbar

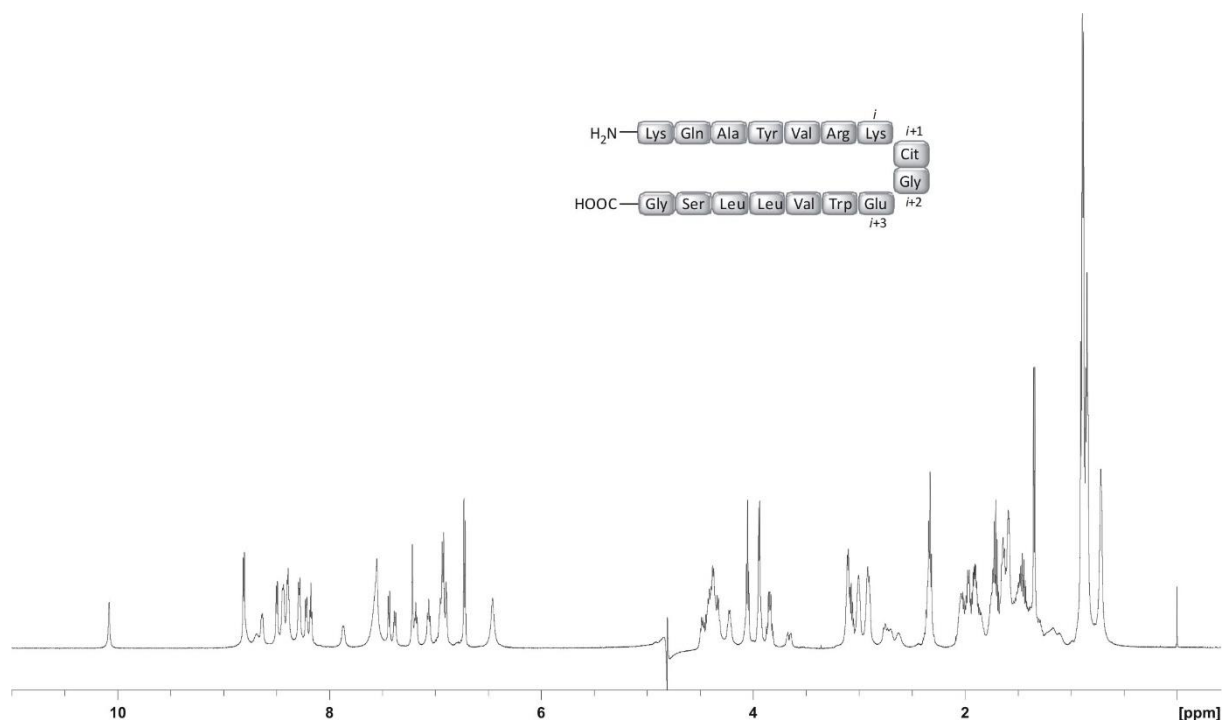
6.7.7 KQAYVRKXGEWVLLSG (102), (X = Cit), (SLD303)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.26$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C_{18} 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{86}H_{139}N_{25}O_{23}]^{3+}$ (M+3H); ber.: 631.3574; gef.: 616.3596.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.05	1.91	H _γ	1.45
					H _δ	1.71
					H _ε	3.00
11	Gln	8.80	4.41	1.97	H _γ	2.32
12	Ala	8.49	4.43	1.35		
13	Tyr	8.28	4.90	2.91; 2.77	2,6-H	6.92
					3,5-H	6.72
14	Val	8.69	4.39	2.02	H _γ	0.89
15	Arg	8.39	4.34	1.59; 1.33	H _γ	1.22
					H _δ	2.72; 2.63
					NH _ε	6.95
16	Lys	8.28	4.36	1.64	H _γ	1.38; 1.31
					H _δ	1.73
					H _ε	2.92
17	Cit	8.63	4.37	2.93	H _γ	1.38
					H _δ	1.73; 1.64
18	Gly	8.38	3.94; 3.66			
19	Glu	7.86	4.48	2.04; 1.90	H _γ	2.35
20	Trp	8.43	4.91	3.11	2-H	7.21
					4-H	7.38
					5-H	7.18
					6-H	7.06
					7-H	7.43
					NH _ε	10.08
21	Val	8.78	4.08	1.84	H _γ	0.83
22	Leu	8.28	4.22	1.55; 1.43	H _γ	1.43
					H _δ	0.72
23	Leu	8.43	4.39	1.59	H _γ	1.59
					H _δ	0.89; 0.84
24	Ser	8.21	4.48	3.85		
<i>C</i> -term	Gly	8.17	3.94			

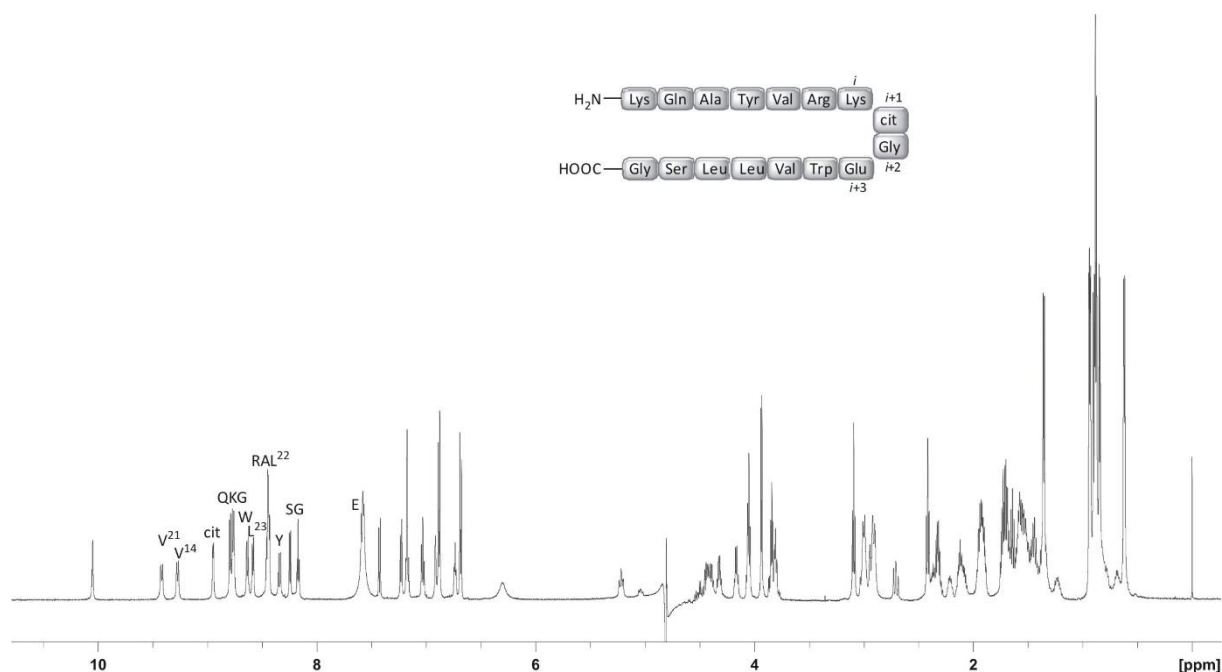
6.7.8 KQAYVRKxGEWVLLSG (103), (x = cit), (SLD304)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 3.99$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C_{18} 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{86}H_{139}N_{25}O_{23}]^{3+}$ (M+3H); ber.: 631.3574; gef.: 616.3593.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Experimenteller Teil

Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.05	1.90	H _γ	1.45
					H _δ	1.71
					H _ε	3.00
11	Gln	8.79	4.43	1.94	H _γ	2.32
12	Ala	8.42	4.52	1.35		
13	Tyr	8.34	5.21	2.90; 2.71	2,6-H	6.88
					3,5-H	6.68
14	Val	9.27	4.69	2.09	H _γ	0.92
15	Arg	8.44	4.31	1.43; 0.69	H _γ	0.81
					H _δ	2.38; 2.22
					NH _ε	6.73
16	Lys	8.76	4.45	1.66	H _γ	1.35; 1.24
					H _δ	1.56
					H _ε	2.90
17	cit	8.94	4.05	3.09	H _γ	1.56; 1.49
					H _δ	1.73
18	Gly	8.76	3.85; 3.82			
19	Glu	7.58	4.64	2.13; 1.94	H _γ	2.41
20	Trp	8.63	5.04	3.02; 2.95	2-H	7.17
					4-H	7.23
					5-H	7.03
					6-H	7.17
					7-H	7.42
					NH _ε	10.05
21	Val	9.42	4.59	2.14	H _γ	0.94; 0.89
22	Leu	8.42	4.17	1.54; 1.35	H _γ	1.35
					H _δ	0.62
23	Leu	8.53	4.41	1.58	H _γ	1.58
					H _δ	0.86
24	Ser	8.24	4.50	3.84		
<i>C</i> -term	Gly	8.17	3.94			

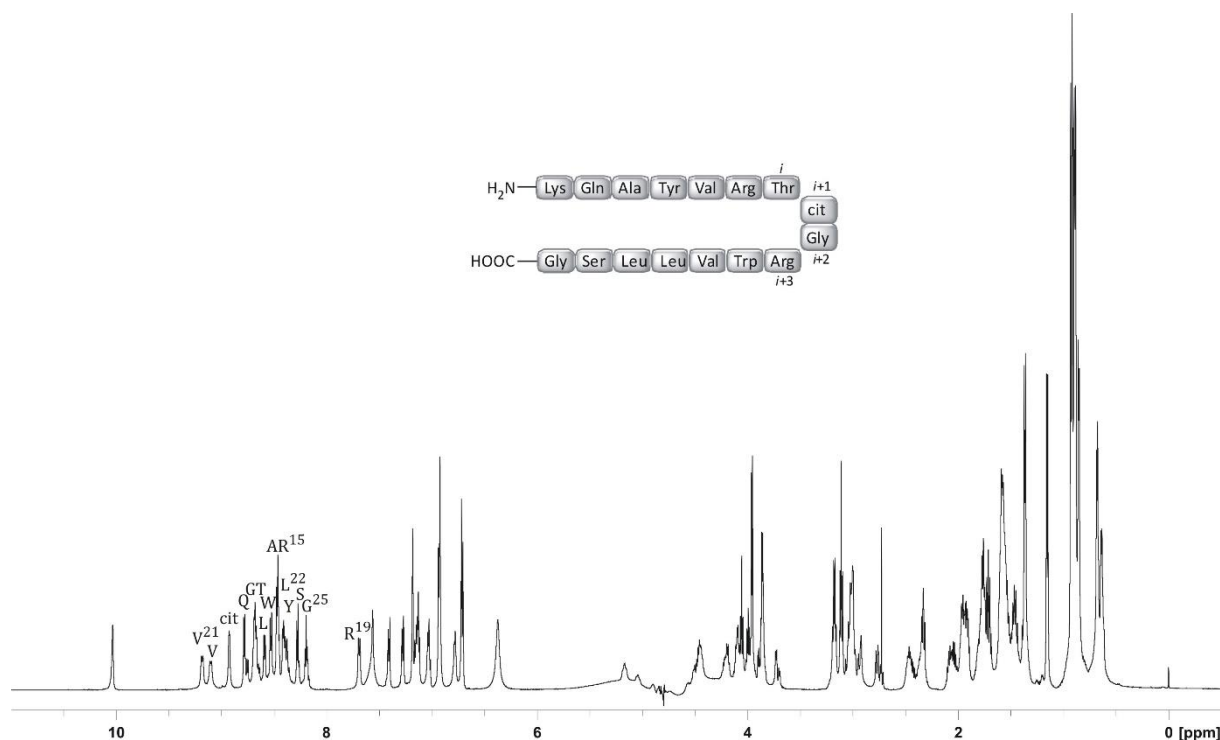
6.7.9 KQAYVRTxGRWVLLSG (176), (x = cit), (SLD344)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.07$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C₁₈ 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₅H₁₃₉N₂₇O₂₂]²⁺ (M+2H); ber.: 946.0367; gef.: 946.0366.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.05	1.91	H _γ	1.45
					H _δ	1.71
					H _ε	3.01
11	Gln	8.78	4.44	1.96	H _γ	2.32
12	Ala	8.45	4.54	1.36		
13	Tyr	8.38	5.16	2.93; 2.75	2,6-H	6.93
					3,5-H	6.71
14	Val	9.10	4.57	2.03	H _γ	0.91
15	Arg	8.46	4.45	1.46	H _γ	0.96; 0.68
					H _δ	2.47; 2.35
					NH _ε	6.78
16	Thr	8.66	4.47	3.99	H _γ	1.15
17	cit	8.92	4.09	3.10	H _γ	1.58; 1.52
					H _δ	1.76
18	Gly	8.68	3.88; 3.71			
19	Arg	7.69	4.57	1.55	H _γ	1.78
					H _δ	3.17
					NH _ε	7.12
20	Trp	8.53	5.04	3.02	2-H	7.18
					4-H	7.27
					5-H	7.02
					6-H	7.12
					7-H	7.41
					NH _ε	10.03
21	Val	9.18	4.49	2.08	H _γ	0.90
22	Leu	8.41	4.19	1.56; 1.36	H _γ	1.35
					H _δ	0.66
23	Leu	8.59	4.43	1.58	H _γ	1.57
					H _δ	0.86
24	Ser	8.27	4.51	3.85		
<i>C</i> -term	Gly	8.19	3.95			

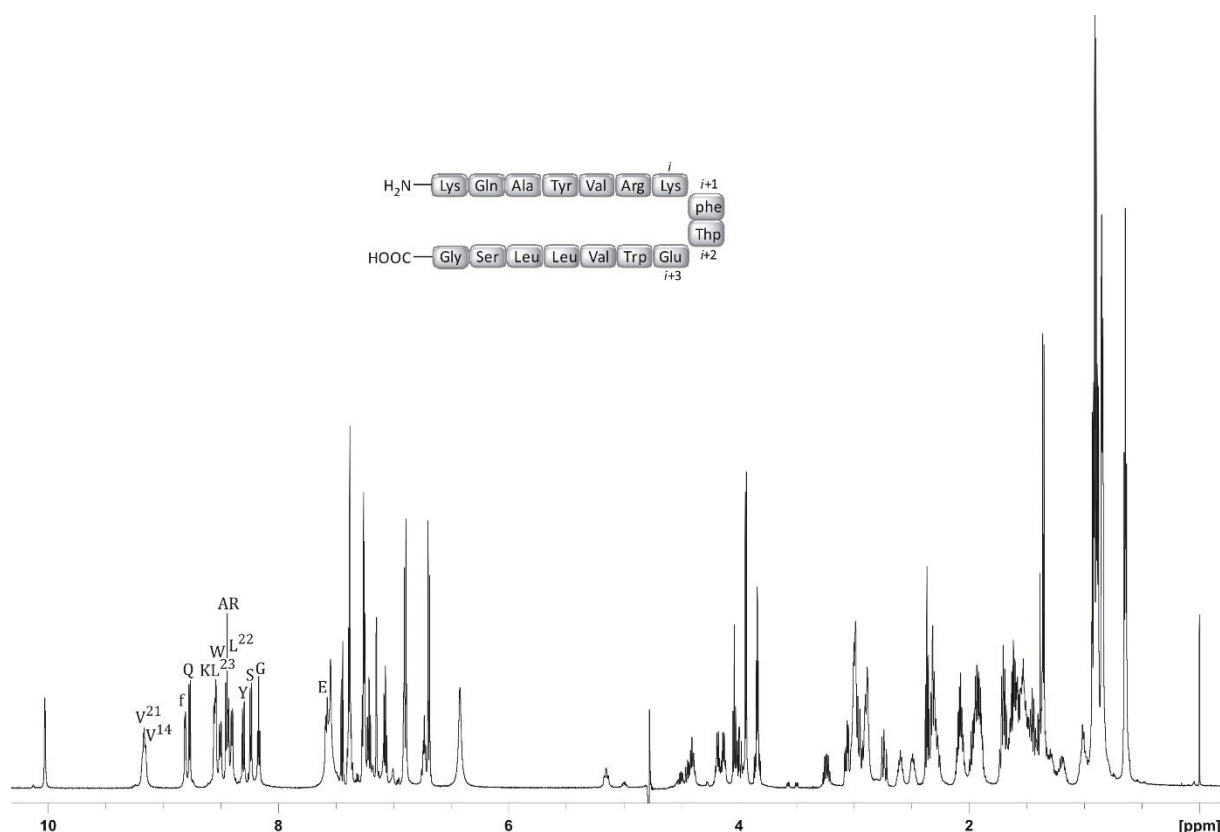
6.7.10 KQAYVRKf-Thp-EWVLLSG (189), (SLD409)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.76$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C₁₈ 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₆H₁₃₉N₂₅O₂₃]³⁺ (M+3H); ber.: 631.3574; gef.: 616.3593.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.04	1.91	H _γ	1.44
					H _δ	1.70
					H _ε	2.99
11	Gln	8.77	4.43	1.94	H _γ	2.32
12	Ala	8.45	4.50	1.36		
13	Tyr	8.30	5.15	2.89; 2.73	2,6-H	6.89
					3,5-H	6.69
14	Val	9.16	4.61	2.07	H _γ	0.91
15	Arg	8.44	4.13	1.52	H _γ	1.00; 0.92
					H _δ	2.60; 2.48
					NH _ε	6.73
16	Lys	8.55	4.39	1.63	H _γ	1.29; 1.18
					H _δ	1.50
					H _ε	2.89
17	phe	8.81	4.57	3.06; 2.95	2,6-H	7.38
					3,5-H	7.25
					4-H	7.38
18	Thp	-	4.45	1.71; 1.69	H _γ	3.24
					H _δ	4.00; 3.98
19	Glu	7.58	4.54	2.07; 1.97	H _γ	2.37
20	Trp	8.50	4.99	2.98	2-H	7.15
					4-H	7.26
					5-H	7.07
					6-H	7.21
					7-H	7.45
					NH _ε	10.03
21	Val	9.17	4.52	2.08	H _γ	0.84
22	Leu	8.40	4.18	1.54; 1.38	H _γ	1.38
					H _δ	0.64
23	Leu	8.54	4.39	1.63	H _γ	1.49
					H _δ	0.86
24	Ser	8.24	4.49	3.84		
<i>C</i> -term	Gly	8.17	3.94			

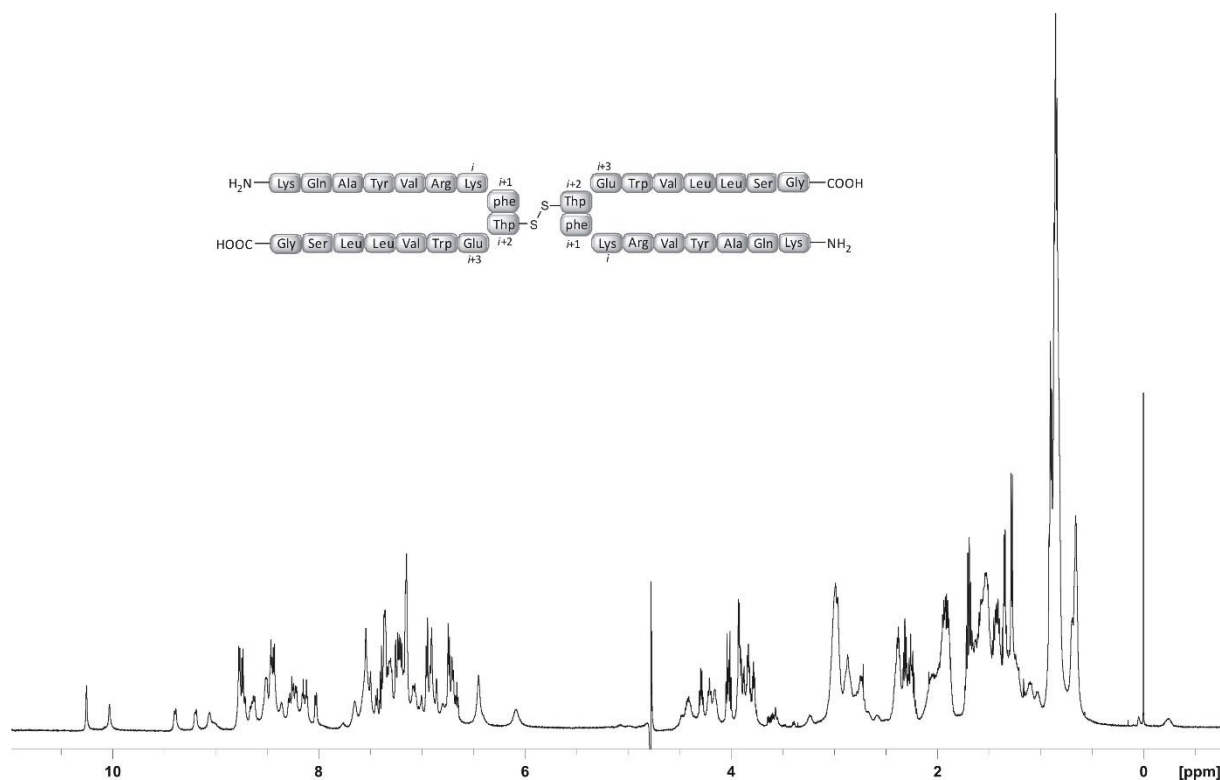
6.7.11 dimer[KQAYVRKf-Thp-EWVLLSG] (193), (SLD416)

Es wurden 36 mg des Rohpeptides SLD409 (s. Kap. 6.7.10) in 20 mL eines auf $pH = 8.37$ eingestellten, 50 mM Ammoniumcarbonatpuffers gelöst und über Nacht bei RT rühren gelassen. Reaktionskontrolle mittels Analytischer HPLC zeigte keinen Umsatz. Es wurden 50 μ L einer 30%igen H_2O_2 -Lösung zugegeben. Nach 1 h bei RT wurde ein vollständiger Umsatz erzielt. Das Lösungsmittel wurde durch gefriertrocknen entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.65$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C_{18} 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{184}H_{280}N_{46}O_{44}S_2]^{5+}$ ($M+5H$); ber.: 781.8189; gef.: 781.8187.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, $pH = 3.0$)/ D_2O 11:1.



hairpin 1

Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
N-term	Lys	-	4.03	1.90	H _γ	1.44
					H _δ	1.70
					H _ε	2.99
11	Gln	8.77	4.41	1.94	H _γ	2.31
12	Ala	8.45	4.43	1.35		
13	Tyr	8.28	5.07	2.89; 2.74	2,6-H	6.91
					3,5-H	6.69
14	Val	9.00	4.48	2.04	H _γ	0.88
15	Arg	8.42	4.14	1.54	H _γ	1.08
					H _δ	2.66; 2.57
					NH _ε	6.80
16	Lys	7.53	4.39	1.59	H _γ	1.27; 1.18
					H _δ	1.59
					H _ε	2.85
17	phe	8.55	4.40	2.97	2,6-H	n/a
					3,5-H	n/a
					4-H	n/a
18	Thp	-	4.42	n/a	H _γ	3.62
					H _δ	n/a
19	Glu	7.76	4.53	2.07; 1.98	H _γ	2.36
20	Trp	8.44	4.98	3.02	2-H	7.15
					4-H	7.20
					5-H	7.07
					6-H	7.15
					7-H	7.44
					NH _ε	10.03
21	Val	9.00	4.47	2.05	H _γ	0.89
22	Leu	8.36	4.22	1.55	H _γ	1.39
					H _δ	0.67
23	Leu	8.51	4.39	1.60; 1.53	H _γ	1.28
					H _δ	0.85; 0.66
24	Ser	8.44	4.48	3.78		
C-term	Gly	8.15	3.92			

hairpin 2

Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
N-term	Lys	-	4.01	1.87	H _γ	1.41
					H _δ	1.69
					H _ε	2.98
11	Gln	8.73	4.28	1.91	H _γ	2.24
12	Ala	8.42	4.28	1.28		
13	Tyr	8.03	4.84	2.87; 2.72	2,6-H	6.95
					3,5-H	6.73
14	Val	8.72	4.20	1.95	H _γ	0.84
15	Arg	8.25	4.87	1.40	H _γ	1.28; 1.21
					H _δ	2.40; 2.25
					NH _ε	6.45
16	Lys	9.39	4.73	1.50	H _γ	1.12; 1.03
					H _δ	1.24
					H _ε	2.79; 2.73
17	phe	8.76	4.63	2.96	2,6-H	n/a
					3,5-H	n/a
					4-H	n/a
18	Thp	-	4.62	1.26; -0.26	H _γ	3.56
					H _δ	2.36; 2.25
19	Glu	9.19	4.83	2.01	H _γ	2.38
20	Trp	9.06	4.46	2.96	2-H	7.24
					4-H	7.20
					5-H	6.66
					6-H	7.15
					7-H	7.40
					NH _ε	10.25
21	Val	8.66	4.15	1.68	H _γ	0.81
22	Leu	8.50	4.88	1.54	H _γ	1.50
					H _δ	0.69; 0.64
23	Leu	8.62	4.66	1.64	H _γ	1.50
					H _δ	0.84
24	Ser	8.47	4.43	3.78		
C-term	Gly	8.11	3.88			

6.8 Ligation der isolierten β -hairpin Peptide des Foldons

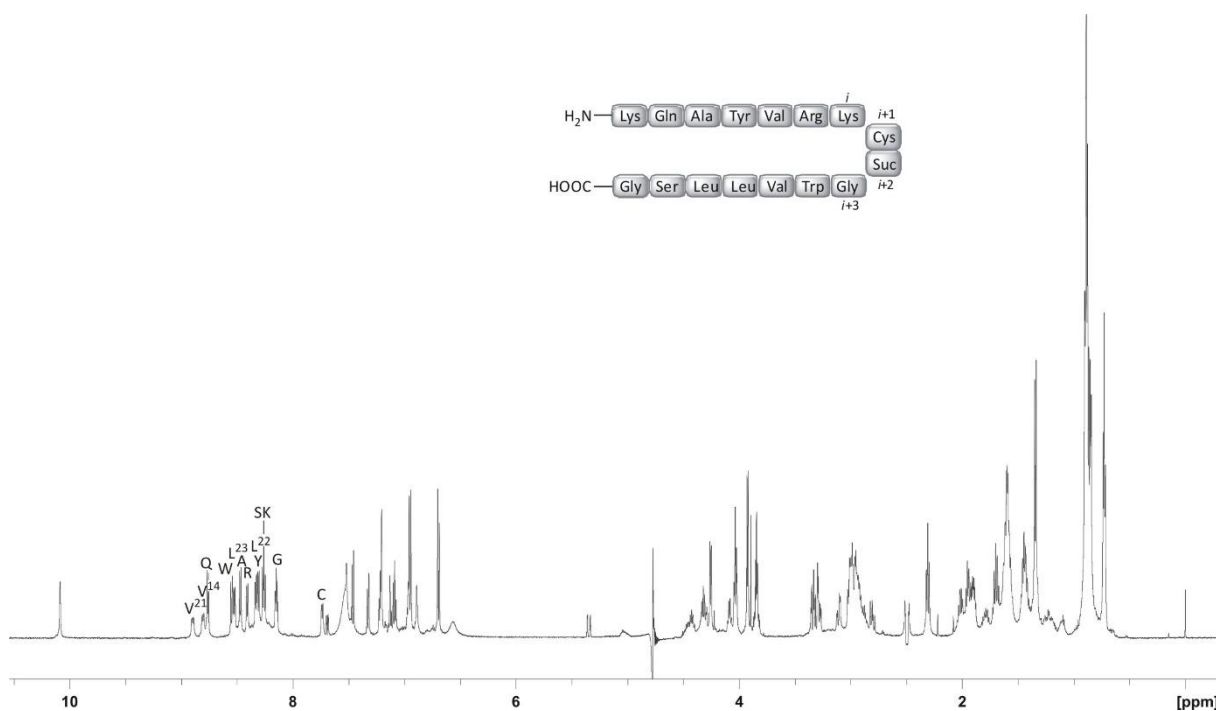
6.8.1 KQAYVRKCEGWVLLSG (121-DS1), (Σ = Suc), (SLD261DS1)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 8.24$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₂H₁₂₈N₂₂O₂₂S]²⁺ (M+2H); ber.: 903.4720; gef.: 903.4714.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.90	H _γ	1.44
					H _δ	1.70
					H _ε	2.99
11	Gln	8.76	4.42	1.94	H _γ	2.31
12	Ala	8.47	4.45	1.34		
13	Tyr	8.31	5.01	2.97; 2.81	2,6-H	6.94
					3,5-H	6.69
14	Val	8.80	4.47	2.00	H _γ	0.88
15	Arg	8.41	4.09	1.61; 1.12	H _γ	1.61
					H _δ	2.90
						6.96
16	Lys	8.25	4.31	1.79	H _γ	1.35
					H _δ	1.61
					H _ε	2.95
17	Cys	7.73	4.56	3.34; 3.28		
18	Suc	-	4.03	3.32; 2.49		
19	Gly	-	4.27; 4.23			
20	Trp	8.54	5.04	3.11; 3.11	2-H	7.20
					4-H	7.32
					5-H	7.21
					6-H	7.08
					7-H	7.46
					NH _ε	10.08
21	Val	8.89	4.40	2.00	H _γ	0.88
22	Leu	8.33	4.33	1.58; 1.44	H _γ	1.44
					H _δ	0.71
23	Leu	8.52	4.42	1.58	H _γ	1.58
					H _δ	0.86
24	Ser	8.21	4.46	3.84		
<i>C</i> -term	Gly	8.15	3.93			

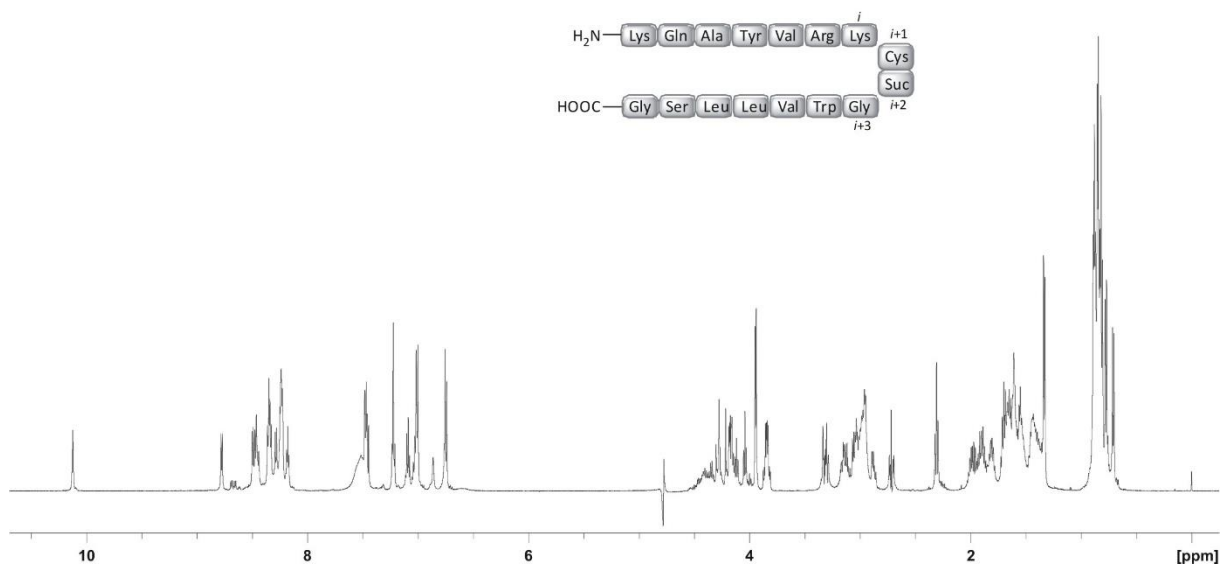
6.8.2 KQAYVRKCEGWLLSG (121-DS2), (Σ = Suc), (SLD261DS2)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 8.43$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₂H₁₂₈N₂₂O₂₂S]²⁺ (M+2H); ber.: 903.4720; gef.: 903.4711.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.04	1.90	H _γ	1.45
					H _δ	1.71
					H _ε	3.00
11	Gln	8.77	4.41	1.97	H _γ	2.31
12	Ala	8.49	4.51	1.34		
13	Tyr	8.33	4.74	2.95; 2.88	2,6-H	7.00
					3,5-H	6.74
14	Val	8.23	4.13	1.55	H _γ	0.86
15	Arg	8.23	4.27	1.66	H _γ	1.52; 1.40
					H _δ	3.05
					NH _ε	7.01
16	Lys	8.34	4.34	1.80	H _γ	1.40
					H _δ	1.71
					H _ε	2.95
17	Cys	8.28	4.53	3.32; 3.05		
18	Suc	-	4.18	3.31; 2.71		
19	Gly	-	4.28; 4.19			
20	Trp	8.47	4.81	3.16; 3.11	2-H	7.22
					4-H	7.45
					5-H	7.21
					6-H	7.08
					7-H	7.47
					NH _ε	10.12
21	Val	8.45	4.16	1.87	H _γ	0.84
22	Leu	8.24	4.13	1.55	H _γ	1.55
					H _δ	0.77; 0.71
23	Leu	8.35	4.43	1.62	H _γ	1.62
					H _δ	0.87
24	Ser	8.25	4.46	3.85		
<i>C</i> -term	Gly	8.17	3.94			

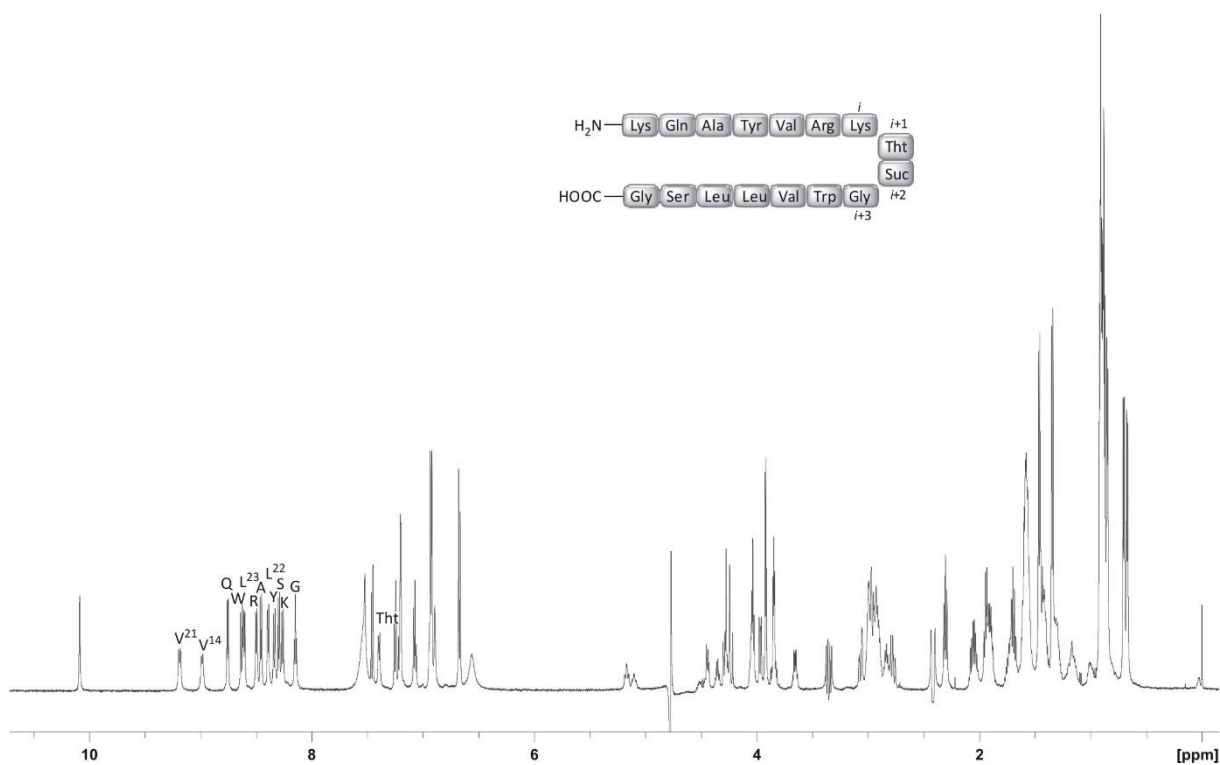
6.8.3 KQAYVRKTh*t*ΣGWVLLSG (129-DS1), (Σ = Suc), (SLD250DS1)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.31$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C₁₈ 3 µm, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₃H₁₃₀N₂₂O₂₂S]²⁺ (M+2H); ber.: 910.9812; gef.: 910.9828.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.04	1.89	H _γ	1.44
					H _δ	1.70
					H _ε	2.99
11	Gln	8.75	4.45	1.94	H _γ	2.31
12	Ala	8.45	4.49	1.34		
13	Tyr	8.33	5.10	2.97; 2.78	2,6-H	6.93
					3,5-H	6.67
14	Val	8.98	4.63	2.05	H _γ	0.89
15	Arg	8.49	4.05	1.58; 0.99	H _γ	1.16
					H _δ	2.90; 2.82
					NH _ε	6.93
16	Lys	8.26	4.28	1.73	H _γ	1.30
					H _δ	1.56
					H _ε	2.95
17	Tht	7.39	4.45	3.65	H _γ	1.46
18	Suc	-	3.97	3.35; 2.41		
19	Gly	-	4.28; 4.23			
20	Trp	8.63	5.18	3.06; 2.94	2-H	7.20
					4-H	7.25
					5-H	7.21
					6-H	7.07
					7-H	7.39
					NH _ε	10.08
21	Val	9.18	4.52	2.03	H _γ	0.90
22	Leu	8.39	4.35	1.58; 1.42	H _γ	1.42
					H _δ	0.70; 0.67
23	Leu	8.60	4.45	1.58	H _γ	1.58
					H _δ	0.86
24	Ser	8.29	4.52	3.83		
<i>C</i> -term	Gly	8.14	3.92			

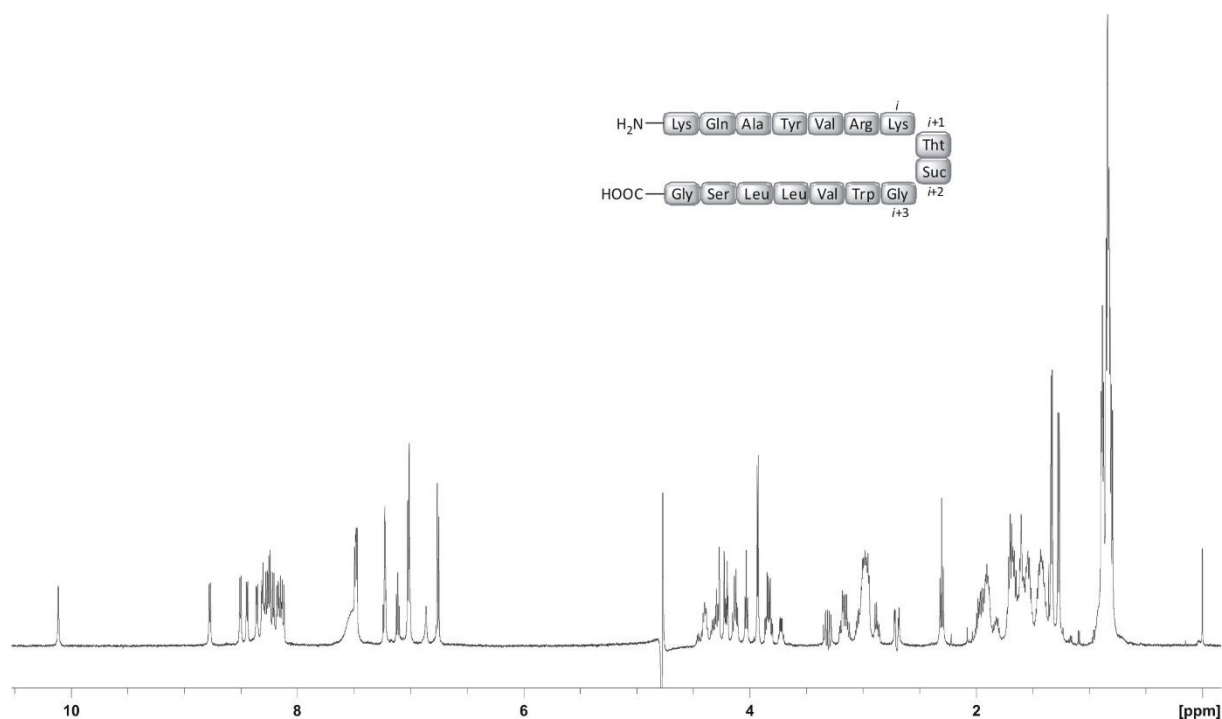
6.8.4 KQAYVRKTh*t*ΣGWVLLSG (129-DS2), (Σ = Suc), (SLD250DS2)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.52$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C₁₈ 3 µm, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₃H₁₃₀N₂₂O₂₂S]²⁺ (M+2H); ber.: 910.9812; gef.: 910.9828.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H _α	H _β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.89	H _γ	1.43
					H _δ	1.70
					H _ε	2.99
11	Gln	8.77	4.38	1.96	H _γ	2.31
12	Ala	8.50	4.41	1.33		
13	Tyr	8.27	4.70	2.96; 2.88	2,6-H	7.01
					3,5-H	6.75
14	Val	8.29	4.12	1.91	H _γ	0.83
15	Arg	8.24	4.28	1.67	H _γ	1.42
					H _δ	3.02
					NH _ε	7.00
16	Lys	8.35	4.40	1.83	H _γ	1.39
					H _δ	1.68
					H _ε	2.99
17	Tht	8.12	4.62	3.72	H _γ	1.27
18	Suc	-	4.21	3.30; 2.70		
19	Gly	-	4.28; 4.21			
20	Trp	8.44	4.77*	3.19; 3.14	2-H	7.22
					4-H	7.46
					5-H	7.23
					6-H	7.11
					7-H	7.48
					NH _ε	10.11
21	Val	8.24	4.14	1.88	H _γ	0.81
22	Leu	8.16	4.33	1.55	H _γ	1.55
					H _δ	0.85
23	Leu	8.31	4.40	1.61	H _γ	1.61
					H _δ	0.84
24	Ser	8.21	4.46	3.83		
<i>C</i> -term	Gly	8.14	3.93			

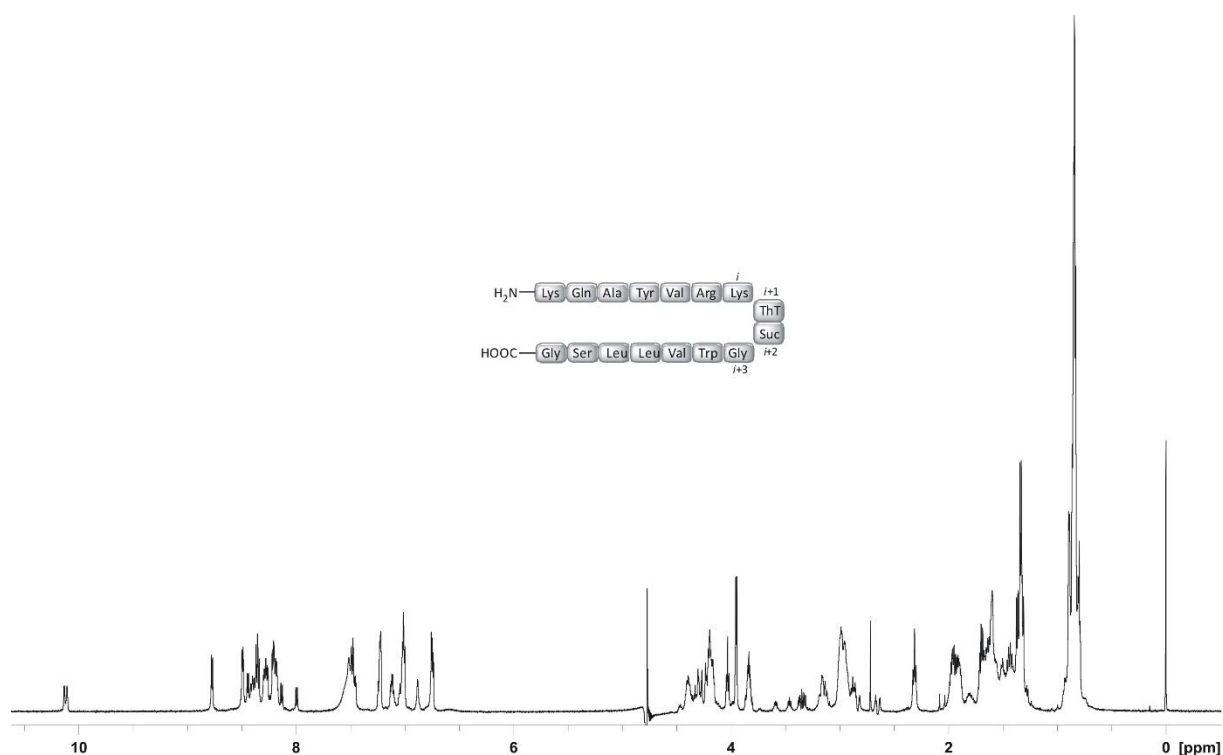
* Kein Kreuzsignal aufgrund der WATERGATE Wasserunterdrückung

6.8.5 KQAYVRKThTSGWVLLSG (130), (Σ = Suc), (SLD453DS1/DS2)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt. Die beiden Diastereomere konnten nicht auf der HPLC getrennt werden.

HR-MS (ESI): für $[C_{83}H_{130}N_{22}O_{22}S]^{2+}$ (M+2H); ber.: 910.9812; gef.: 910.9817.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



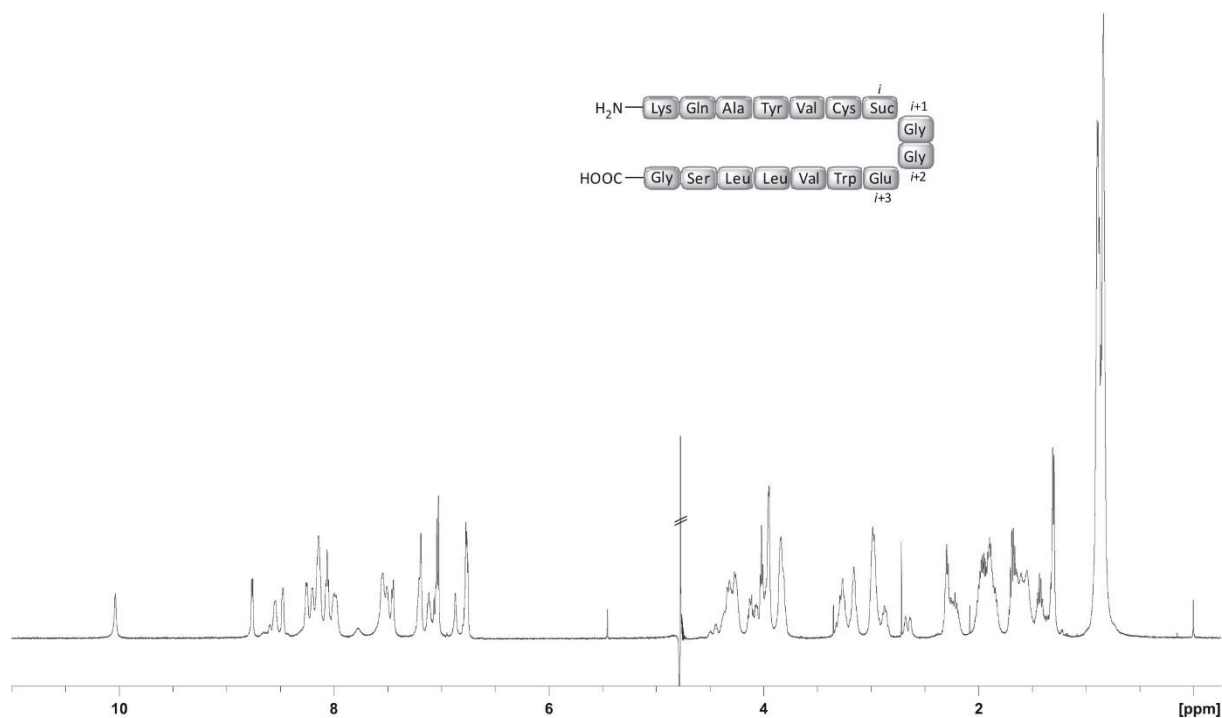
6.8.6 KQAYVCΣGGEWVLLSG (119), (Σ = Suc), (AH30)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 9.13$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μm, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₇₇H₁₁₄N₁₈O₂₄S]⁺ (M+1H); ber.: 1707.8047; gef.: 1707.8057.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.

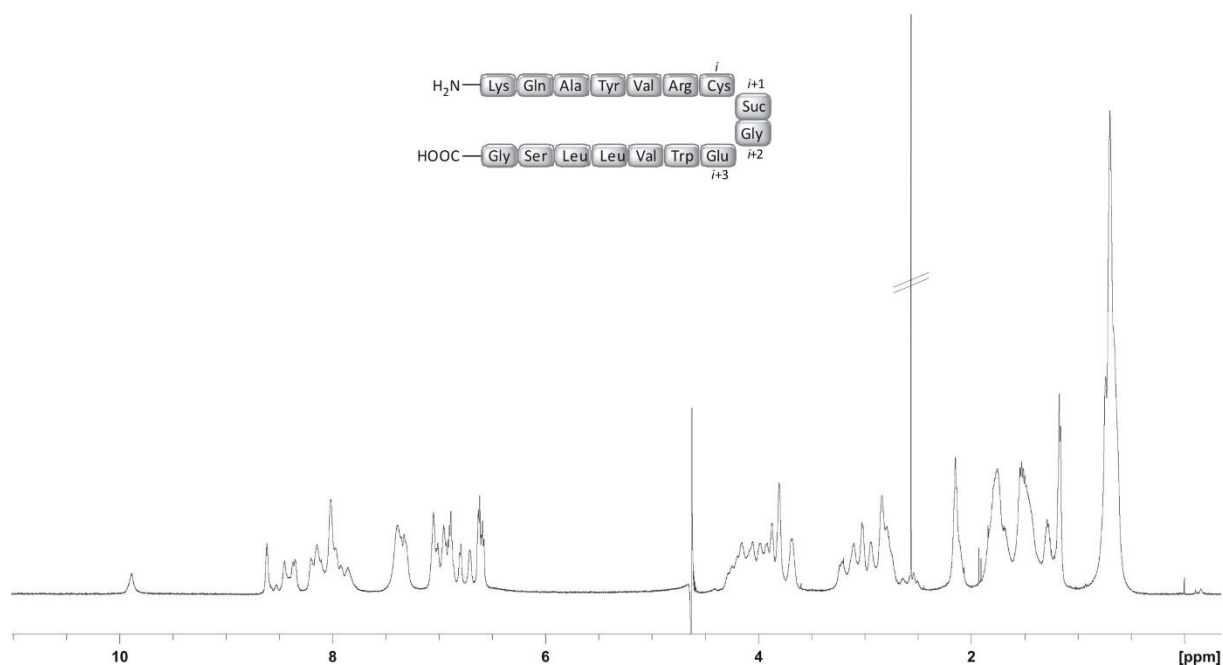


6.8.7 KQAYVRCΣGEWVLLSG (120), (Σ = Suc), (AH29)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HR-MS (ESI): für $[C_{81}H_{123}N_{21}O_{24}S]^{2+}$ (M+2H); ber.: 903.9458; gef.: 903.9448.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



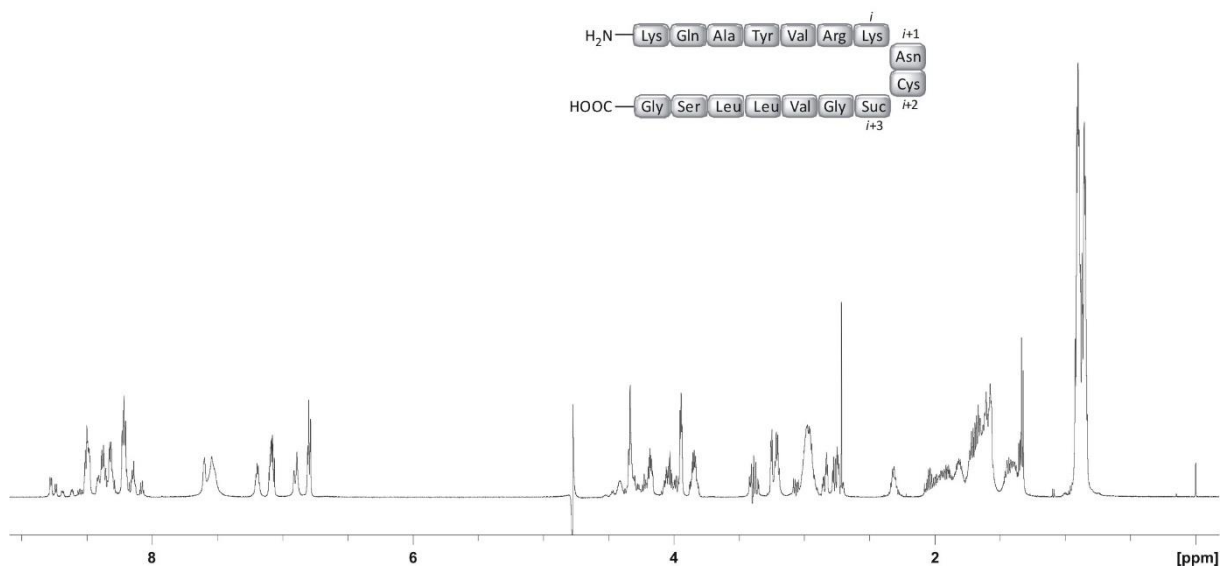
6.8.8 KQAYVRKNCΣGVLLSG (122), (Σ = Suc), (AH31)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 7.02$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 µm, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₇₅H₁₂₄N₂₂O₂₂S]³⁺ (M+3H); ber.: 578.6383; gef.: 578.6400.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



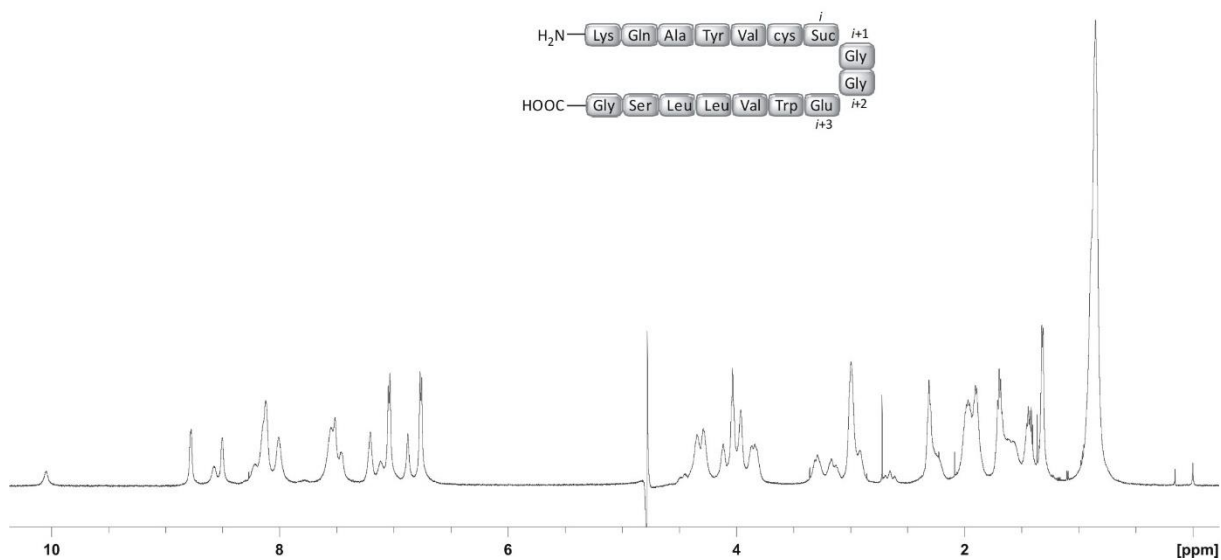
6.8.9 KQAYVcΣGGEWVLLSG (123), (Σ = Suc), (AH55)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 9.16$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 µm, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₇₇H₁₁₄N₁₈O₂₄S]²⁺ (M+2H); ber.: 854.4060; gef.:854.4061.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



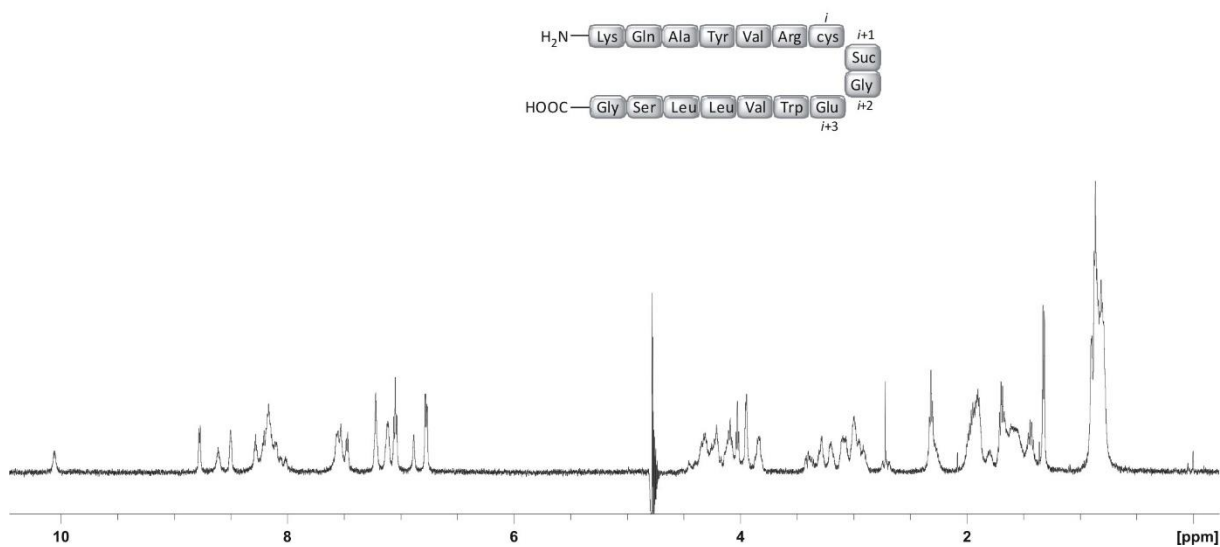
6.8.10 KQAYVRcΣGEWVLLSG (124), (Σ = Suc), (AH54)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 8.86$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 µm, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₁H₁₂₃N₂₁O₂₄S]²⁺ (M+2H); ber.: 903.9460; gef.: 903.9460.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



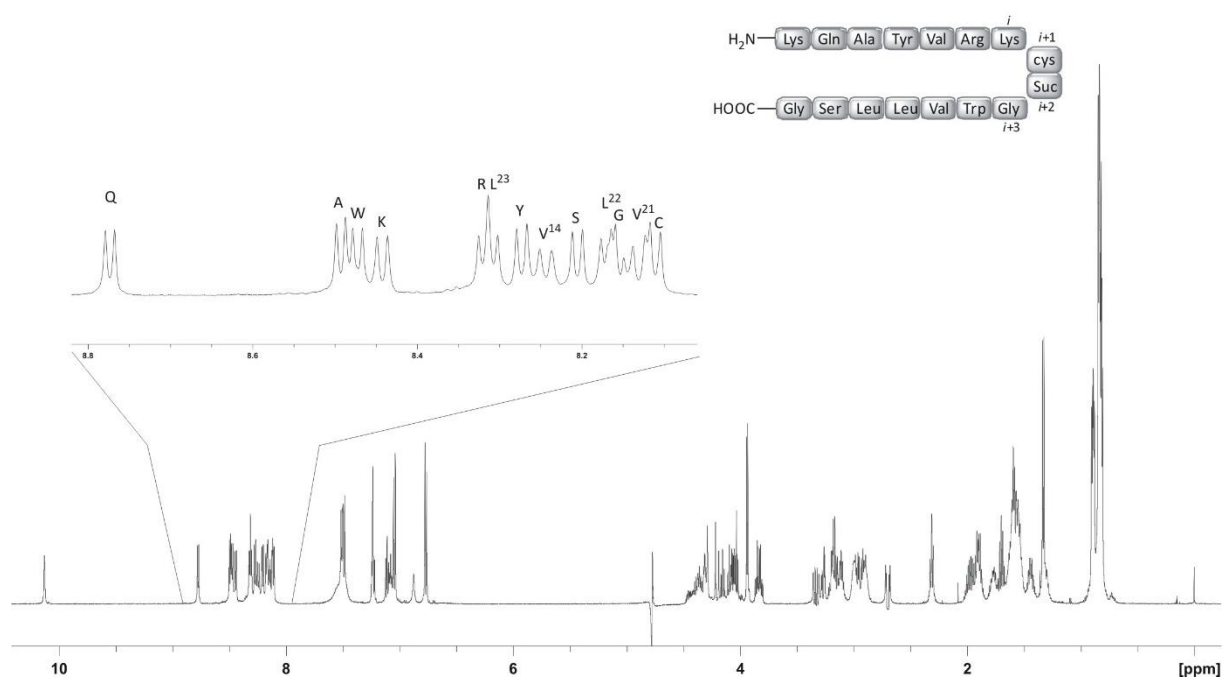
6.8.11 KQAYVRKc Σ GWVLLSG (125-DS1), (Σ = Suc), (AH53DS1)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: t_s = 8.53 min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₂H₁₂₈N₂₂O₂₂S]²⁺ (M+2H); ber.: 903.4720; gef.: 903.4721.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.89	H _γ	1.45
					H _δ	1.71
					H _ε	3.00
11	Gln	8.77	4.36	1.97	H _γ	2.32
12	Ala	8.49	4.39	1.33		
13	Tyr	8.27	4.67	2.98; 2.91	2,6-H	7.04
					3,5-H	6.76
14	Val	8.13	4.15	1.90	H _γ	0.82
15	Arg	8.32	4.32	1.78; 1.62	H _γ	1.54
					H _δ	3.12
					NH _ε	7.07
16	Lys	8.44	4.32	1.78	H _γ	1.31
					H _δ	1.61
					H _ε	2.91
17	Cys	8.11	4.43	3.27; 3.17		
18	Suc	-	4.07	3.33; 2.70		
19	Gly	-	4.30; 4.20			
20	Trp	8.47	4.76	3.19	2-H	7.23
					4-H	7.49
					5-H	7.23
					6-H	7.10
					7-H	7.50
					NH _ε	10.12
21	Val	8.24	4.11	1.92	H _γ	0.84
22	Leu	8.17	4.36	1.56	H _γ	1.57
					H _δ	0.85
23	Leu	8.30	4.41	1.62	H _γ	1.59
					H _δ	0.87
24	Ser	8.20	4.46	3.85		
<i>C</i> -term	Gly	8.15	3.94			

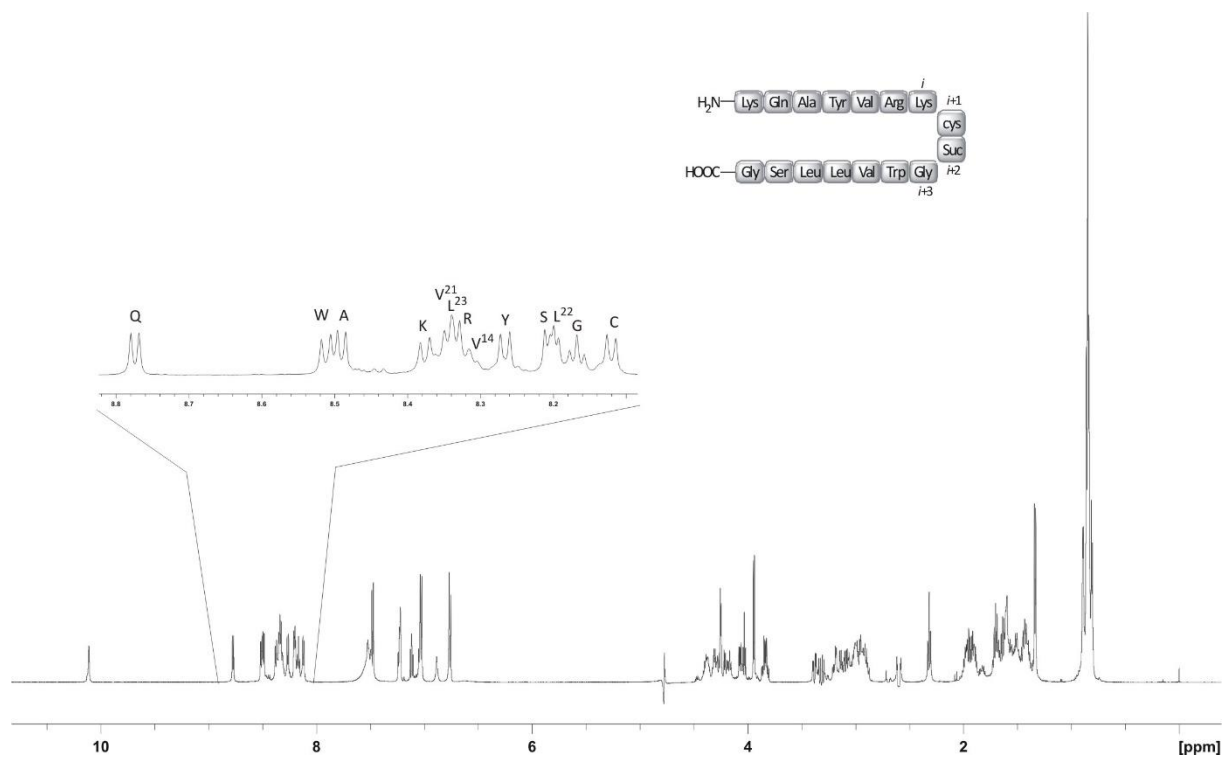
6.8.12 KQAYVRKcΣGWVLLSG (125-DS2), (Σ = Suc), (AH53DS2)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 8.67$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 µm, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₂H₁₂₈N₂₂O₂₂S]²⁺ (M+2H); ber.: 903.4720; gef.: 903.4725.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.90	H _γ	1.45
					H _δ	1.71
					H _ε	3.00
11	Gln	8.77	4.39	1.97	H _γ	2.32
12	Ala	8.49	4.39	1.34		
13	Tyr	8.26	4.67	2.98; 2.91	2,6-H	7.03
					3,5-H	6.76
14	Val	8.30	4.21	1.94	H _γ	0.85
15	Arg	8.31	4.27	1.71	H _γ	1.50; 1.43
					H _δ	3.05
					NH _ε	7.04
16	Lys	8.37	4.32	1.83	H _γ	1.41
					H _δ	1.67
					H _ε	2.93
17	cys	8.12	4.37	3.38; 3.09		
18	Suc	-	4.07	3.32; 2.60		
19	Gly	-	4.25			
20	Trp	8.51	4.81	3.19; 3.14	2-H	7.22
					4-H	7.48
					5-H	7.23
					6-H	7.11
					7-H	7.48
					NH _ε	10.11
21	Val	8.34	4.18	1.97	H _γ	0.84
22	Leu	8.33	4.32	1.53	H _γ	1.53
					H _δ	0.84
23	Leu	8.19	4.41	1.62	H _γ	1.62
					H _δ	0.89; 0.84
24	Ser	8.20	4.48	3.85		
<i>C</i> -term	Gly	8.16	3.94			

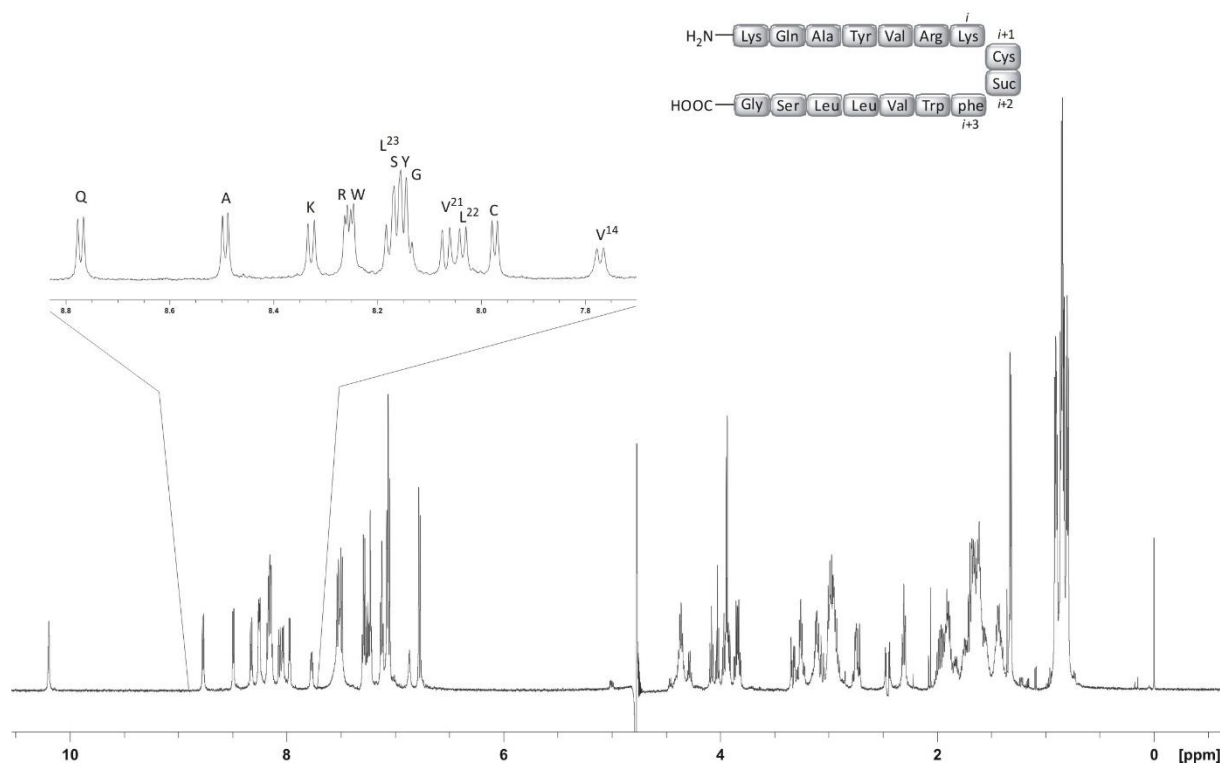
6.8.13 KQAYVRKCEfWVLLSG (159-DS1), (Σ = Suc), (SLD249DS1)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.89$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₉H₁₃₄N₂₂O₂₂S]²⁺ (M+2H); ber.: 948.4955; gef.: 948.4966.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Experimenteller Teil

Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.89	H _γ	1.44
					H _δ	1.70
					H _ε	2.99
11	Gln	8.77	4.36	1.96	H _γ	2.31
12	Ala	8.49	4.33	1.33		
13	Tyr	8.14	4.37	2.73	2,6-H	7.07
					3,5-H	6.77
14	Val	7.77	3.96	1.91	H _γ	0.80; 0.79
15	Arg	8.26	4.28	1.77	H _γ	1.68; 1.56
					H _δ	3.12
					NH _ε	7.12
16	Lys	8.33	4.37	1.84	H _γ	1.42
					H _δ	1.72; 1.68
					H _ε	2.97
17	Cys	7.97	4.72	3.25		
18	Suc	-	3.92	3.00; 2.45		
19	phe	-	5.01	3.33; 3.08	2,6-H	7.29
					3,5-H	7.07
					4-H	7.26
20	Trp	8.25	4.64	2.94	2-H	7.22
					4-H	7.49
					5-H	7.23
					6-H	7.12
					7-H	7.53
					NH _ε	10.20
21	Val	8.06	4.07	1.91	H _γ	0.83
22	Leu	8.03	4.37	1.60	H _γ	1.60
					H _δ	0.86
23	Leu	8.17	4.41	1.68	H _γ	1.63
					H _δ	0.94; 0.85
24	Ser	8.15	4.46	3.83		
<i>C</i> -term	Gly	8.13	3.94			

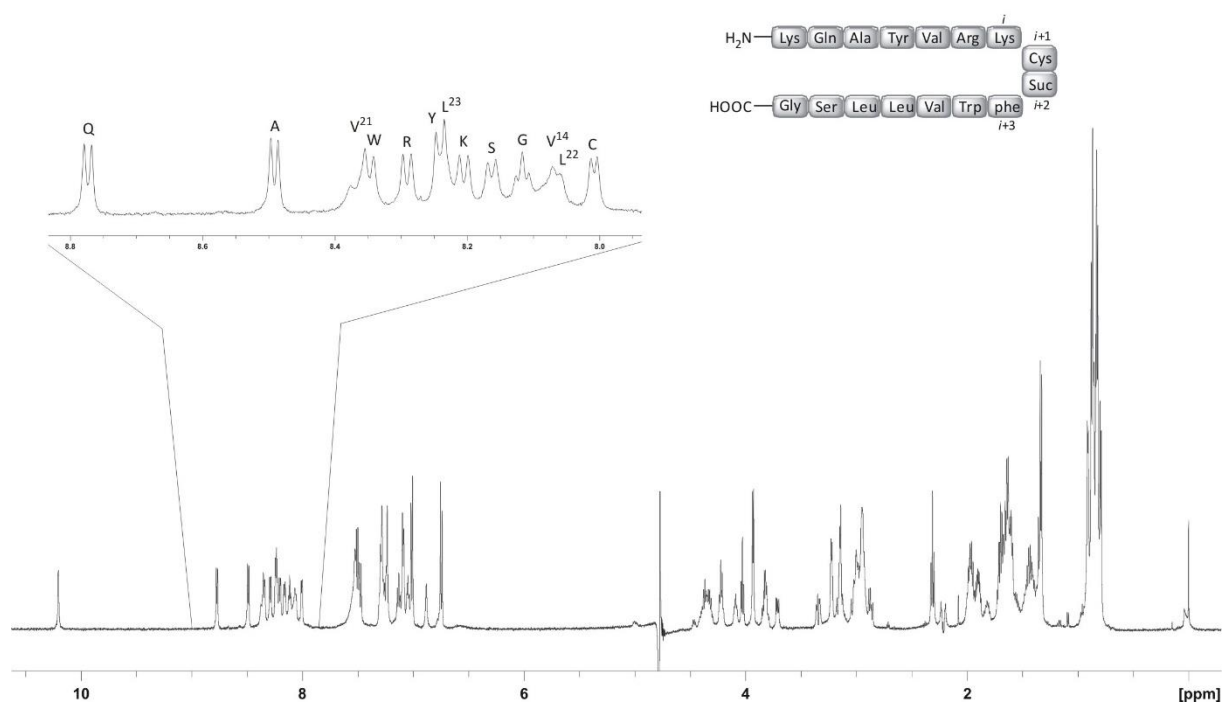
6.8.14 KQAYVRKCEfWVLLSG (159-DS2), (Σ = Suc), (SLD249DS2)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.95$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₈₉H₁₃₄N₂₂O₂₂S]²⁺ (M+2H); ber.: 948.4955; gef.: 948.4968.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Experimenteller Teil

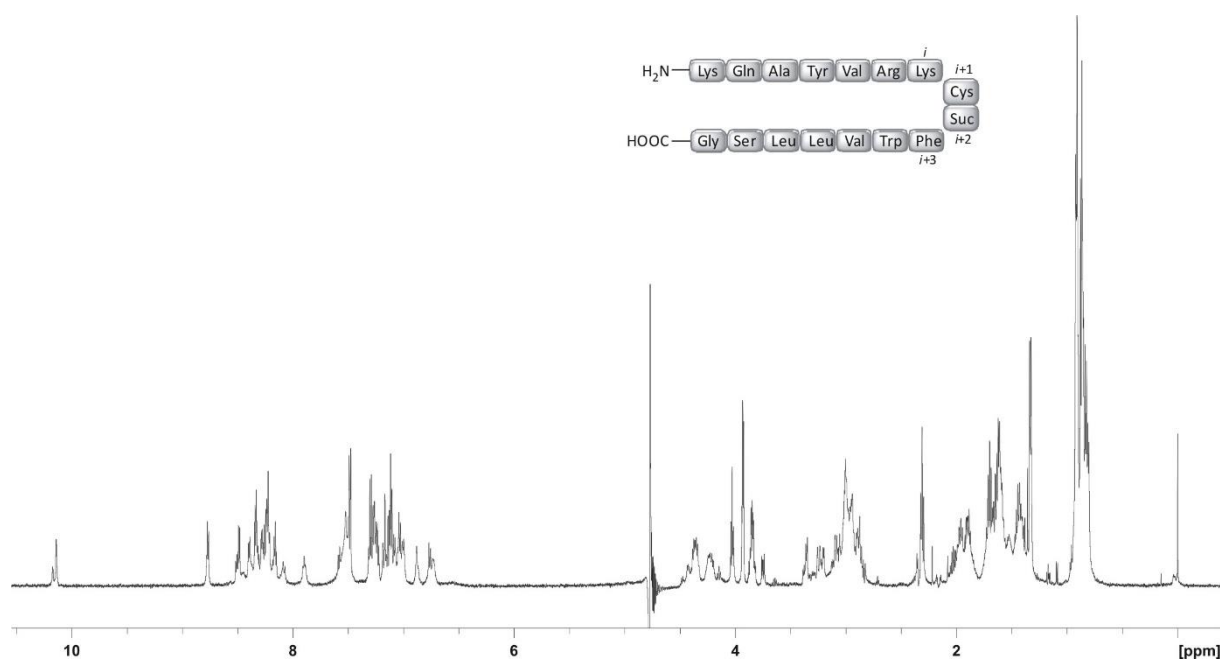
Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.90	H _γ	1.46
					H _δ	1.71
					H _ε	3.00
11	Gln	8.77	4.37	1.97	H _γ	2.32
12	Ala	8.49	4.36	1.34		
13	Tyr	8.24	4.79	2.96; 2.88	2,6-H	7.01
					3,5-H	6.74
14	Val	8.07	4.09	1.99	H _γ	0.84
15	Arg	8.29	4.22	1.68	H _γ	1.48
					H _δ	2.96
					NH _ε	7.05
16	Lys	8.20	4.34	1.83	H _γ	1.41
					H _δ	1.68
					H _ε	2.94
17	Cys	8.00	4.73	3.23		
18	Suc	-	3.71	3.16; 2.21		
19	phe	-	5.00	3.34; 3.03	2,6-H	7.29
					3,5-H	7.09
					4-H	7.28
20	Trp	8.35	4.58	3.15	2-H	7.23
					4-H	7.48
					5-H	7.25
					6-H	7.13
					7-H	7.50
					NH _ε	10.20
21	Val	8.36	4.23	1.97	H _γ	0.88
22	Leu	8.06	4.32	1.59	H _γ	1.59
					H _δ	0.82
23	Leu	8.23	4.41	1.64	H _γ	1.64
					H _δ	0.91; 0.87
24	Ser	8.16	4.48	3.82		
<i>C</i> -term	Gly	8.11	3.94			

6.8.15 KQAYVRKCEFWVLLSG (159a-DS1) (Σ = Suc), (SLD252DS1)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: t_s = 6.31 min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.

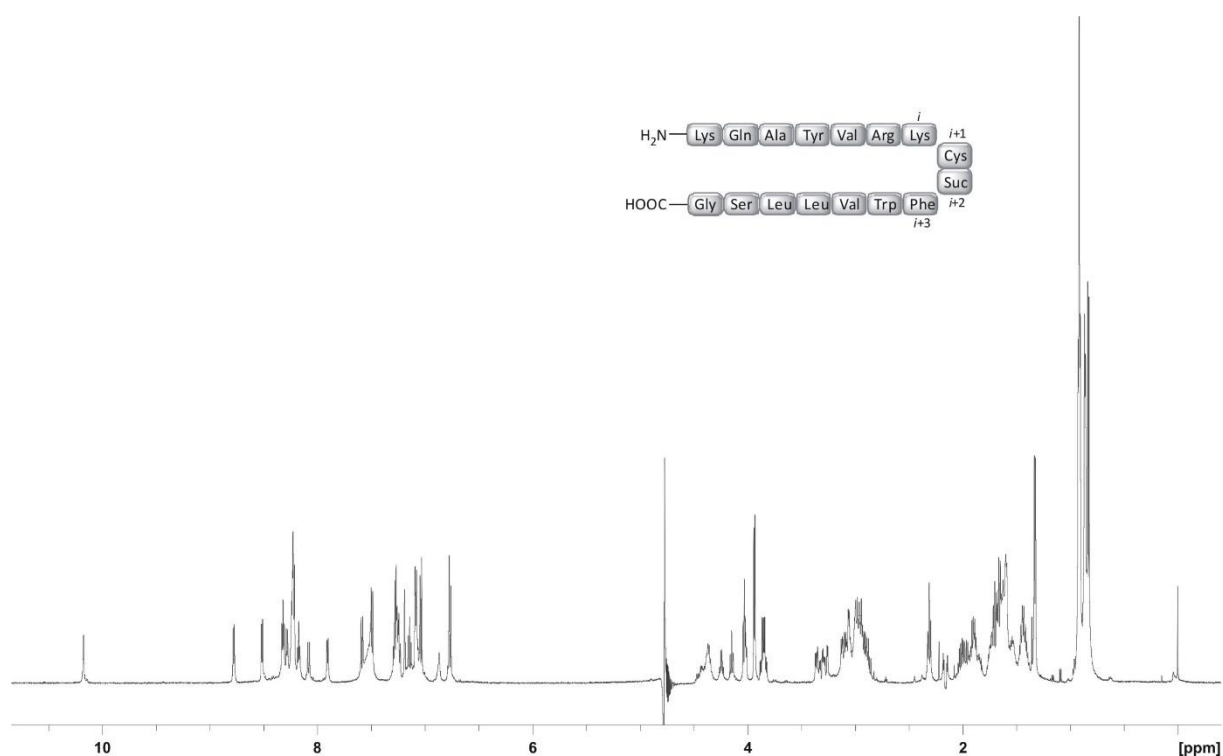


6.8.16 KQAYVRKCEFWVLLSG (159a-DS2), (Σ = Suc), (SLD252DS2)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: t_s = 6.44 min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



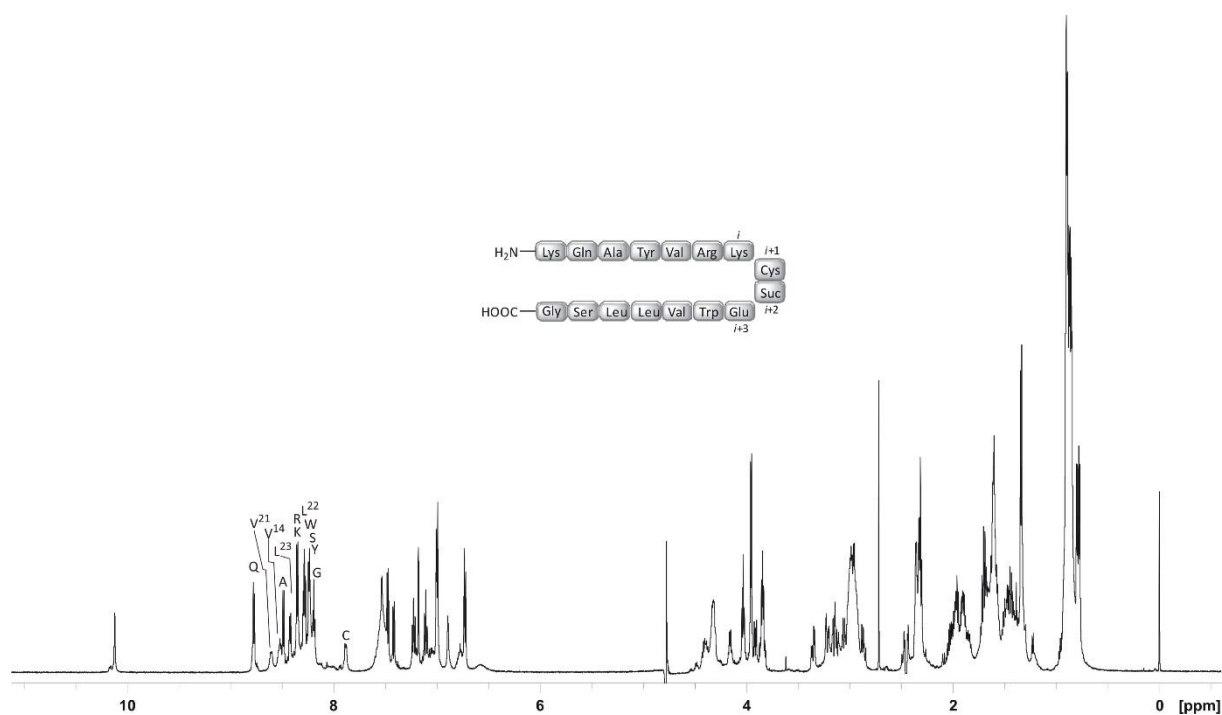
6.8.17 KQAYVRKCZEWVLLSG (157-DS1), (Σ = Suc), (SLD461DS1)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: t_s = 4.51 min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C_{18} 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{85}H_{132}N_{22}O_{24}S]^+$ (M+H); ber.: 1878.9607; gef.: 1878.9618.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



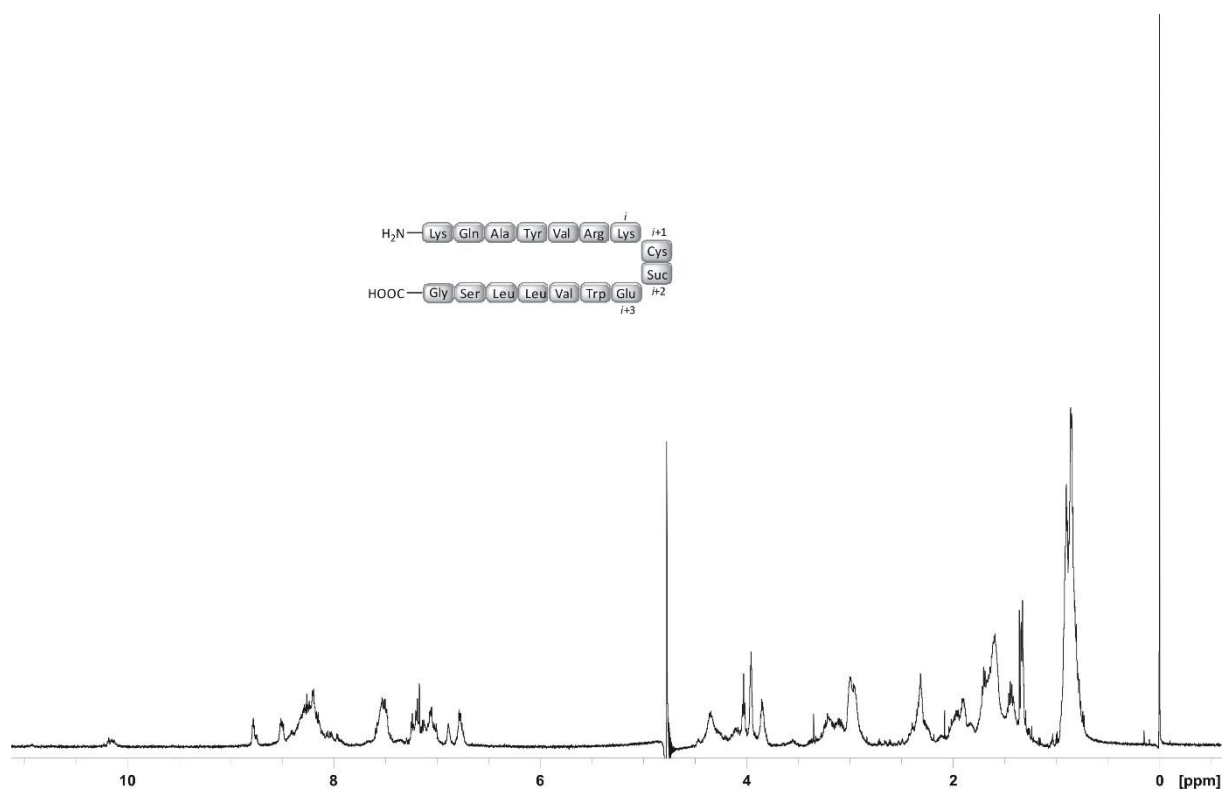
Position	Aminosäure	NH	H_{α}	H_{β}	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.89	H _γ	1.43
					H _δ	1.69
					H _ε	2.99
11	Gln	8.77	4.38	1.95	H _γ	2.30
12	Ala	8.48	4.39	1.34		
13	Tyr	8.27	4.83	2.96; 2.86	2,6-H	6.99
					3,5-H	6.72
14	Val	8.52	4.29	1.97	H _γ	0.86
15	Arg	8.35	4.16	1.64	H _γ	1.32; 1.19
					H _δ	2.95
					NH _ε	6.99
16	Lys	8.35	4.33	1.84	H _γ	1.36
					H _δ	1.64
					H _ε	2.96
17	Cys	7.88	4.53	3.33; 3.21		
18	Suc	-	3.89	3.13; 2.45		
19	Glu	-				
20	Trp	8.22	4.86	3.14; 3.04	2-H	7.17
					4-H	7.42
					5-H	7.22
					6-H	7.10
					7-H	7.47
					NH _ε	10.11
21	Val	8.60	4.29	2.02	H _γ	0.89
22	Leu	8.27	4.31	1.57; 1.48	H _γ	1.48
					H _δ	0.77
23	Leu	8.42	4.41	1.59	H _γ	1.59
					H _δ	0.86
24	Ser	8.23	4.48	3.82		
<i>C</i> -term	Gly	8.18	3.94			

6.8.18 KQAYVRKCSEWVLLSG (157-DS2), (Σ = Suc), (SLD461DS2)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{85}\text{H}_{132}\text{N}_{22}\text{O}_{24}\text{S}]^{2+}$ ($M+2H$); ber.: 939.9840; gef.: 939.9847

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.

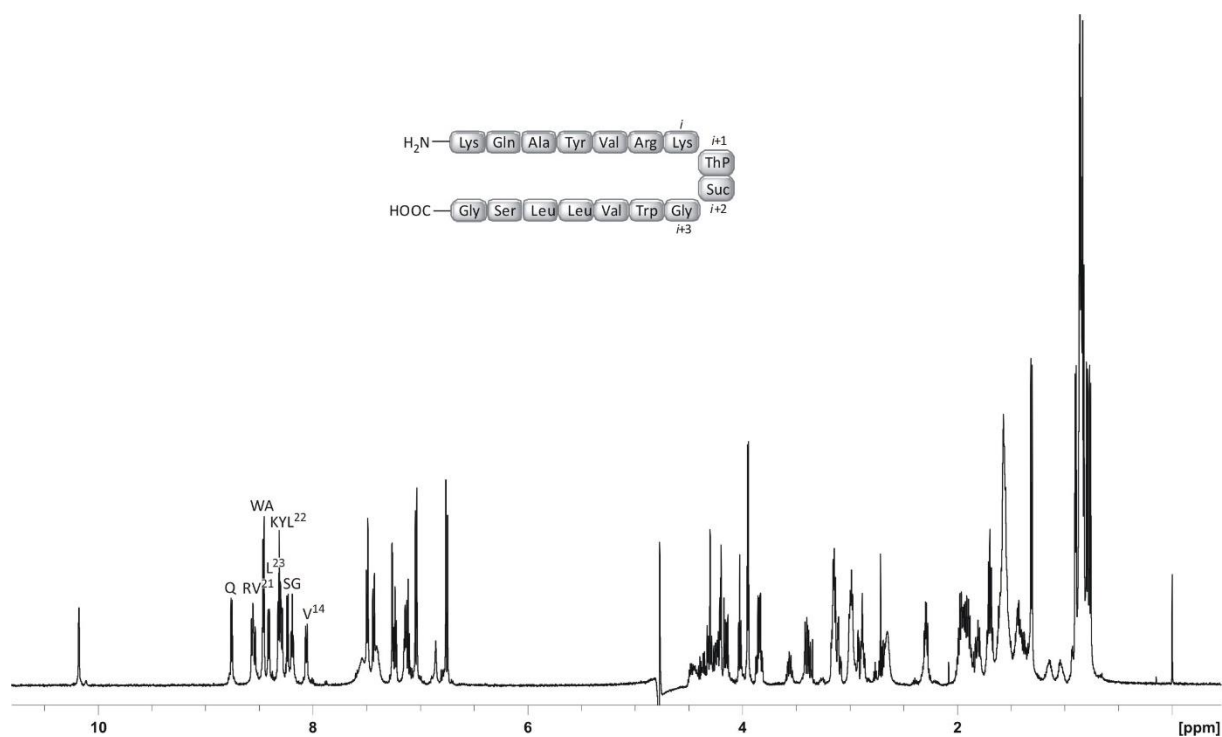


6.8.19 KQAYVRKThPΣGWVLLSG (132-DS1), (Σ = Suc), (SLD454DS1)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HR-MS (ESI): für $[C_{84}H_{132}N_{22}O_{22}S]^2+$ (M+2H); ber.: 916.9812; gef.: 916.9818.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.

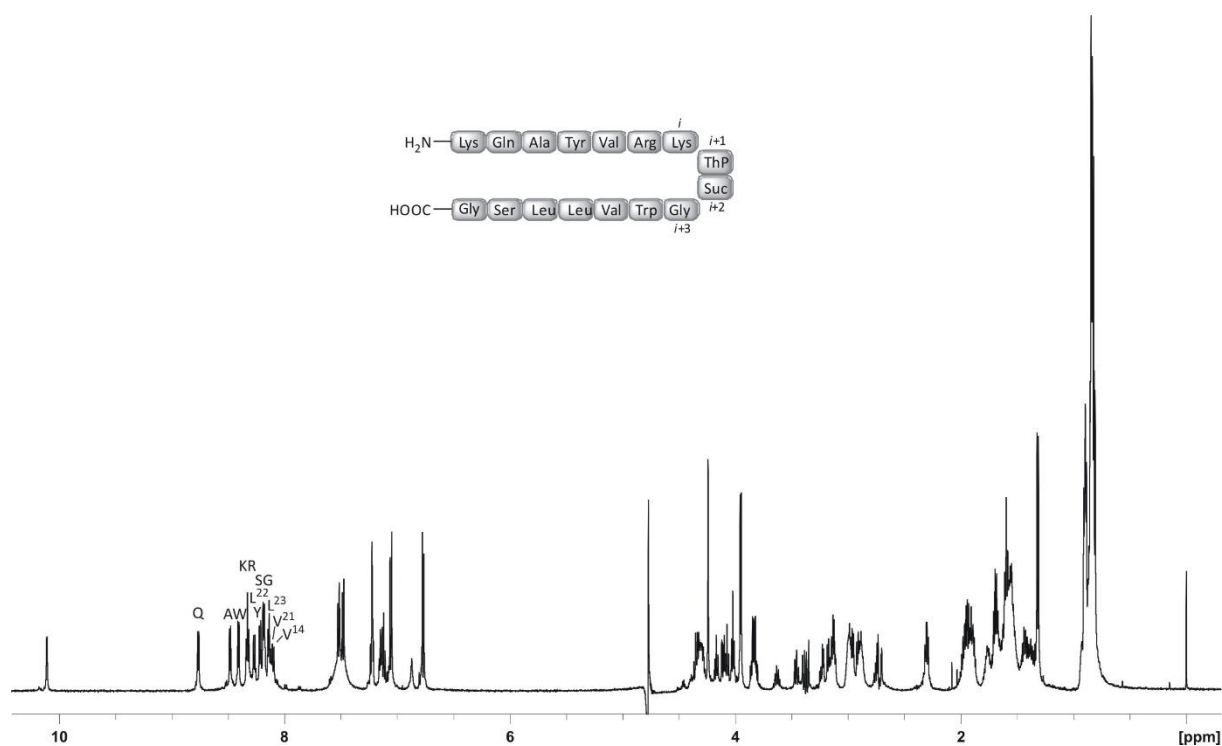


6.8.20 KQAYVRKThPΣGWVLLSG (132-DS2), (Σ = Suc), (SLD454DS2)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HR-MS (ESI): für $[C_{84}H_{132}N_{22}O_{22}S]^{2+}$ (M+2H); ber.: 916.9812; gef.: 916.9818.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.

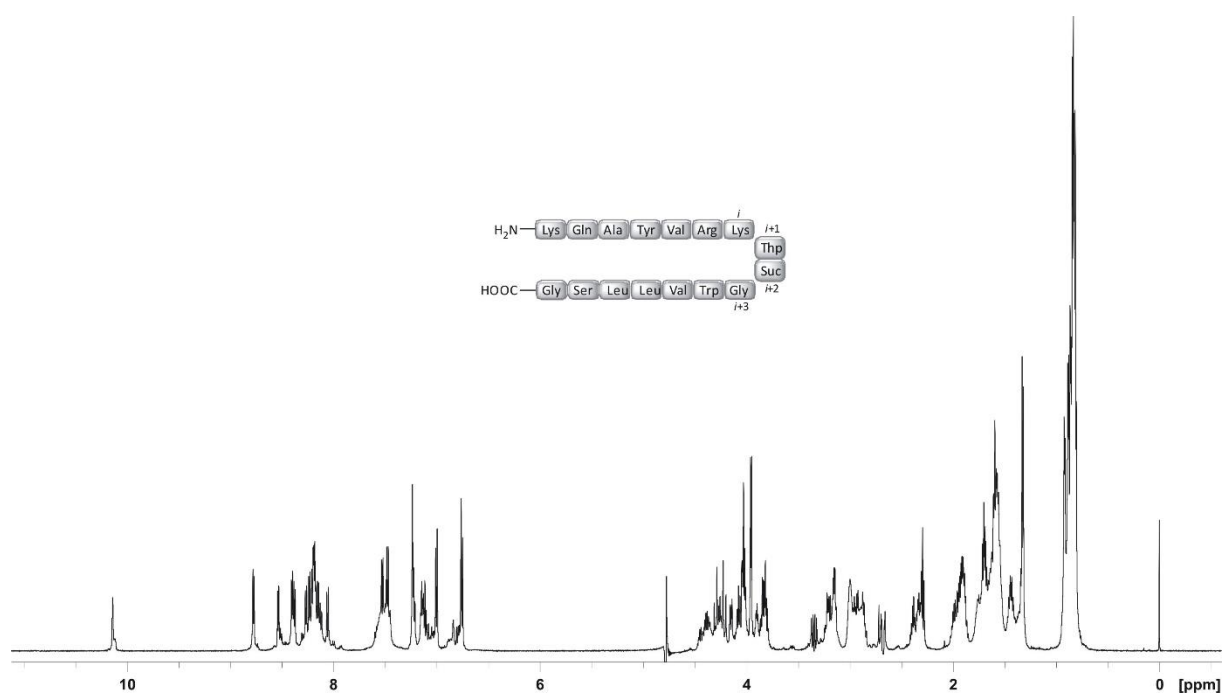


6.8.21 KQAYVRKThpΣGWVLLSG (131-DS1), (Σ = Suc), (SLD455DS1)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HR-MS (ESI): für $[C_{84}H_{132}N_{22}O_{22}S]^{2+}$ (M+2H); ber.: 916.9812; gef.: 916.9816.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.

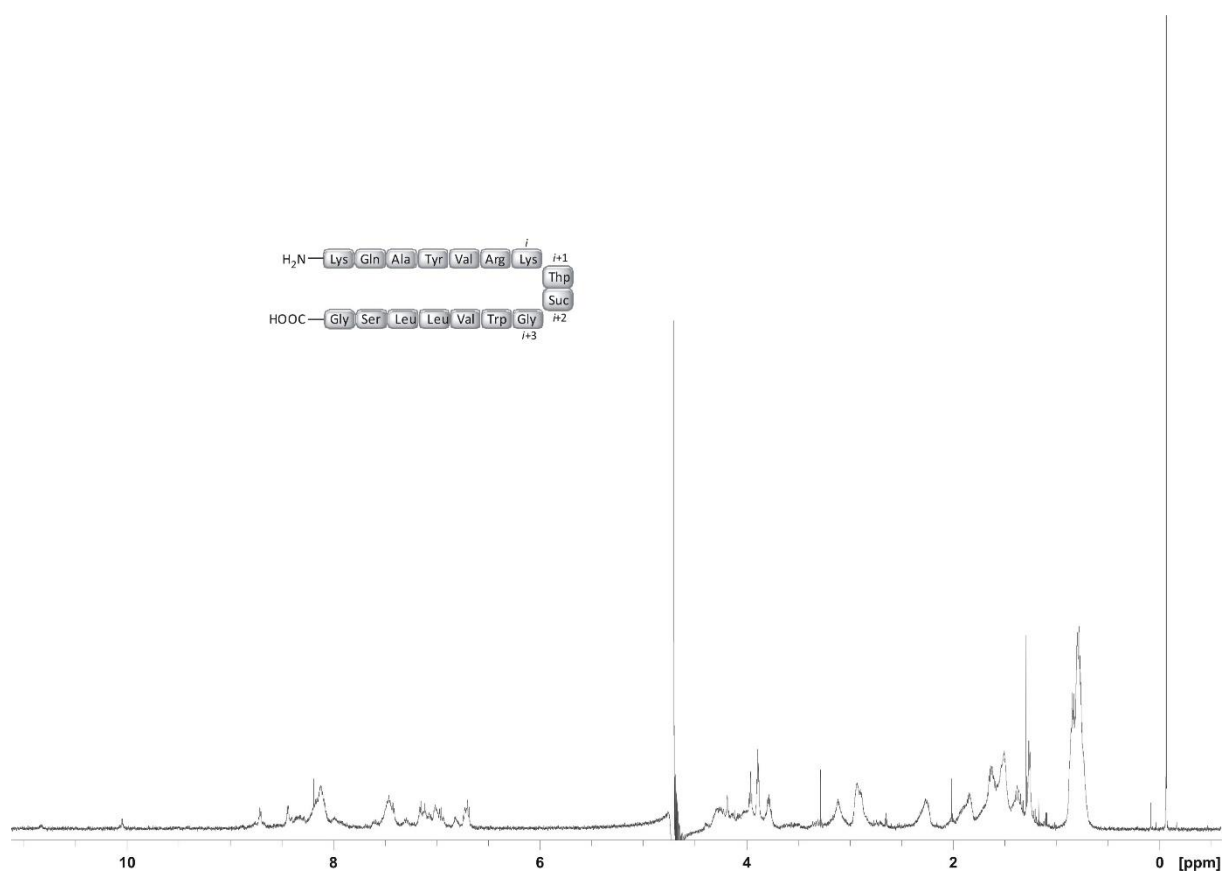


6.8.22 KQAYVRKThpΣGWVLLSG (131-DS2), (Σ = Suc), (SLD455DS2)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HR-MS (ESI): für $[C_{84}H_{132}N_{22}O_{22}S]^{2+}$ (M+2H); ber.: 916.9812; gef.: 916.9825.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.

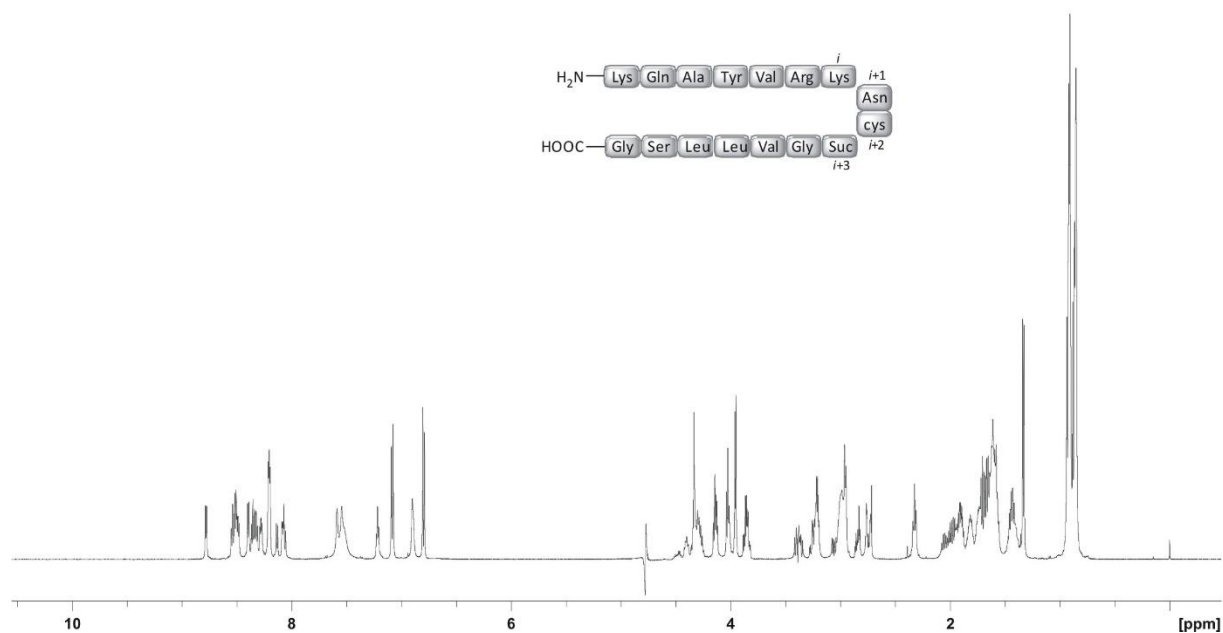


6.8.23 KQAYVRKNcEGVLLSG (126), (Σ = Suc), (AH56)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 7.16$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



6.8.24 KQAYVRK-phe-Thp-EWVLLSG (192), (Σ = Suc), (SLD452)

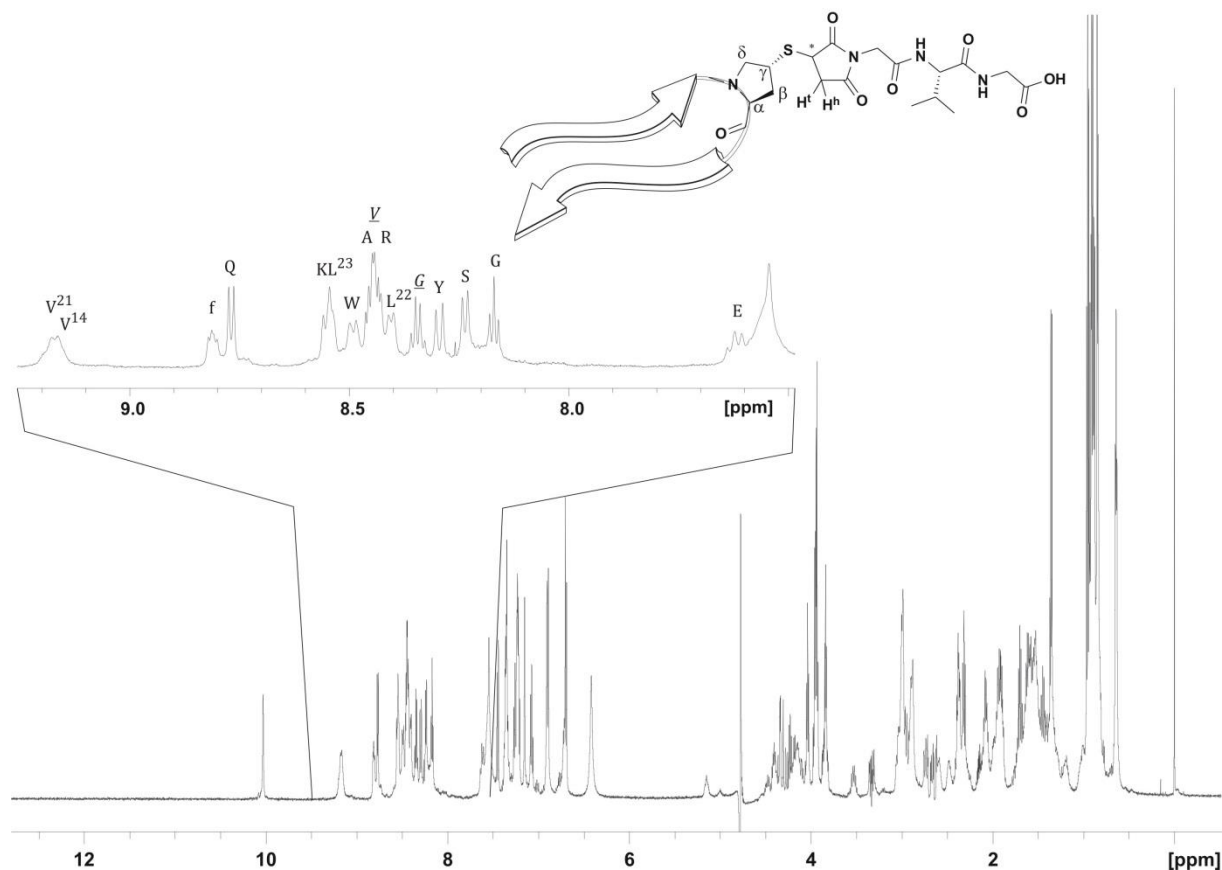
Σ GVG

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: t_s = 4.66 min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C_{18} 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{105}H_{158}N_{26}O_{28}S]^+ (M+2H)$; ber.: 1133.0817; gef.: 1133.0816.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Experimenteller Teil

Position	Aminosäure	NH	H _α	H _β	andere	
N-term	Lys	-	4.04	1.91	H _γ	1.44
					H _δ	1.70
					H _ε	2.99
11	Gln	8.76	4.42	1.92	H _γ	2.31
12	Ala	8.44	4.50	1.35		
13	Tyr	8.29	5.14	2.89; 2.73	2,6-H	6.89
					3,5-H	6.69
14	Val	9.17	4.61	2.07	H _γ	0.91
15	Arg	8.43	4.14	1.51	H _γ	1.04; 0.98
					H _δ	2.59; 2.48
					NH _ε	6.73
16	Lys	8.55	4.40	1.63	H _γ	1.29; 1.18
					H _δ	1.53
					H _ε	2.89
17	phe	8.81	4.58	3.04; 2.94	2,6-H	7.38
					3,5-H	7.25
					4-H	7.38
18	Thp	-	4.46	2.26; 1.73	H _γ	3.53
					H _δ	4.05; 2.35
19	Glu	7.61	4.54	2.08; 1.98	H _γ	2.38
20	Trp	8.49	4.98	2.99	2-H	7.15
					4-H	7.26
					5-H	7.07
					6-H	7.21
					7-H	7.45
					NH _ε	10.03
21	Val	9.18	4.52	2.10	H _γ	0.86
22	Leu	8.40	4.19	1.54; 1.38	H _γ	1.38
					H _δ	0.62
23	Leu	8.54	4.40	1.63	H _γ	1.53
					H _δ	0.85
24	Ser	8.23	4.49	3.84		
C-term	Gly	8.17	3.95			
1	Suc	-	3.97	3.33; 2.63		
2	Gly	-	4.32			
3	Val	8.44	4.24	2.15	H _γ	0.95
C-term	Gly	8.34	3.95			

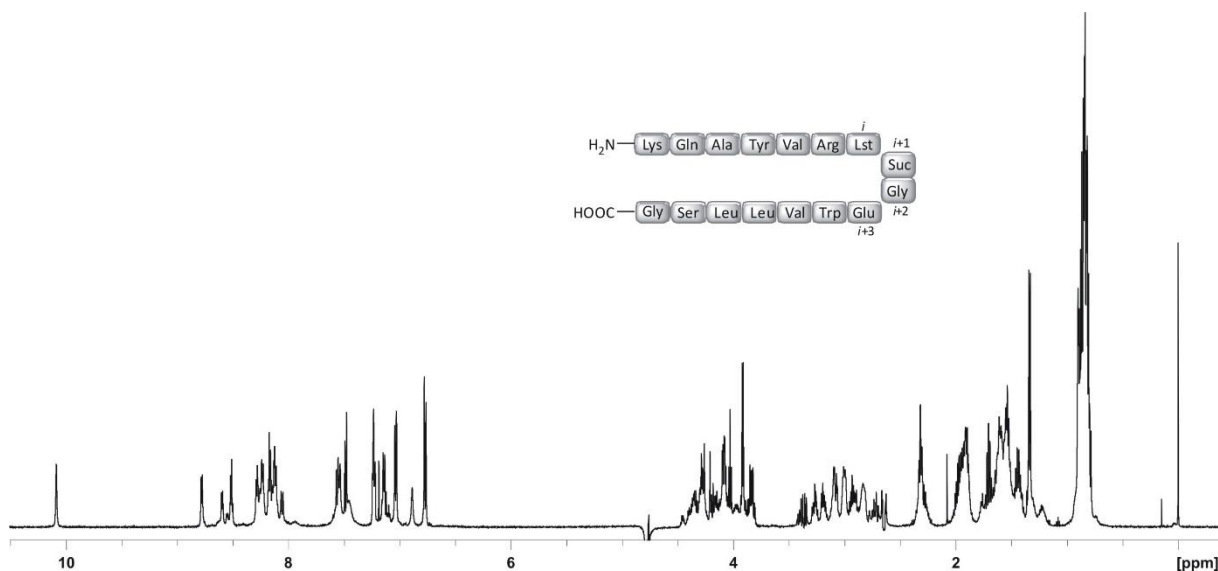
6.8.25 KQAYVRAΣGEWVLLSG (166), (Λ = Lst; Σ = Suc), (ASSL45-3)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: t_s = 4.49 min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C_{18} 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{84}H_{132}N_{22}O_{22}S]^{2+}$ (M+2H); ber.: 917.4876; gef.: 917.4873.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



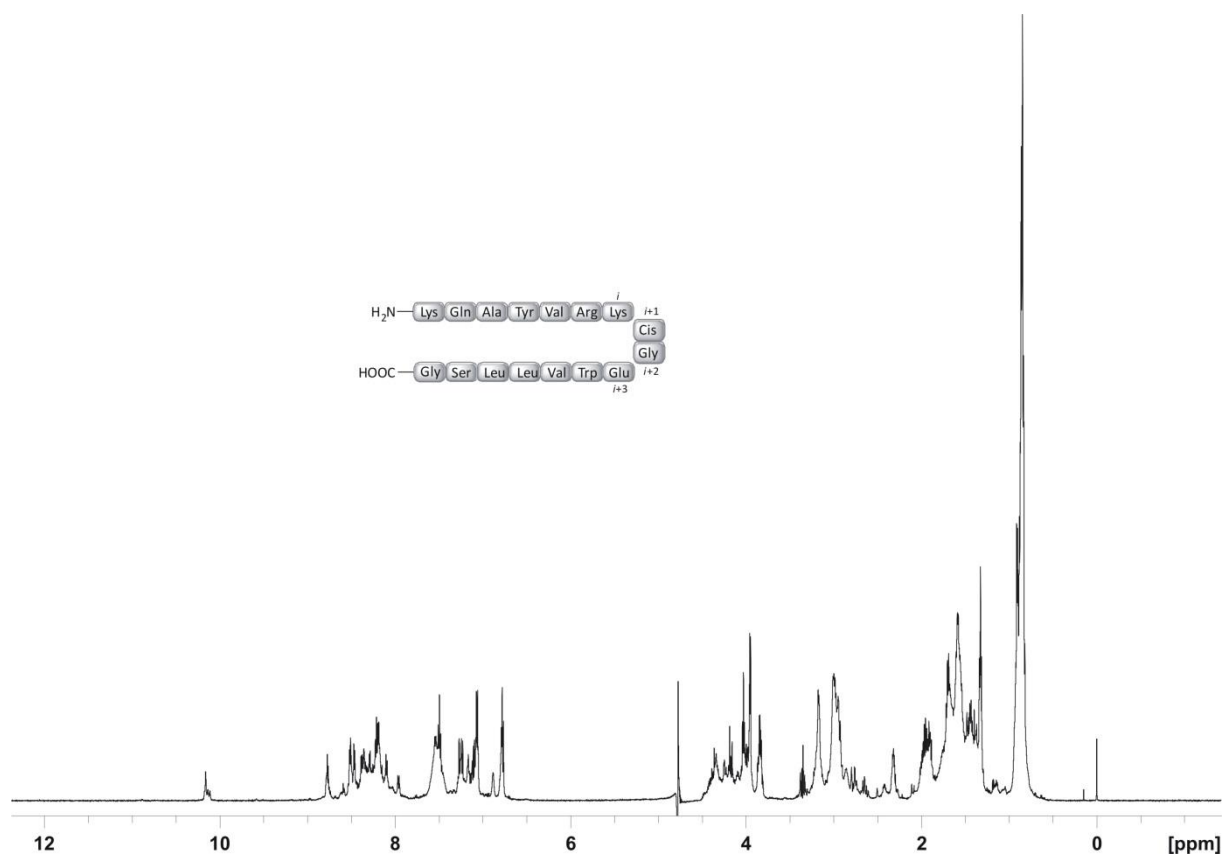
Position	Aminosäure	NH	H_α	H_β	andere	
<i>N</i> -term	Lys	-	4.03	1.90	H _γ	1.43
					H _δ	1.71
					H _ε	3.00
11	Gln	8.78	4.36	1.96	H _γ	2.32
12	Ala	8.51	4.34	1.34		
13	Tyr	8.22	4.65	2.91	2,6-H	7.03
					3,5-H	6.77
14	Val	8.16	4.08	1.91	H _γ	0.85
15	Arg	8.28	4.15	1.77	H _γ	1.58
					H _δ	3.08
					NH _ε	7.15
16	Lst	8.05	3.97	1.42	H _β '	2.71
					H _γ	1.32; 1.21
					H _δ	1.58
					H _ε	3.08
17	Suc	-	4.08	3.37; 2.64		
18	Gly	-	4.27; 4.19			
19	Glu	8.59	4.28	1.89	H _γ	2.29
20	Trp	8.17	4.71	3.26; 3.19		
21	Val	7.94	4.08	1.93	H _γ	0.82
22	Leu	8.25	4.39	1.62	H _γ	1.62
					H _δ	0.87
23	Leu	8.11	4.27	1.53	H _γ	1.53
					H _δ	0.83
24	Ser	8.16	4.45	3.83		
<i>C</i> -term	Gly	8.12	3.91			

6.8.26 KQAYVRKCis Σ GWVLLSG (188-DS1), (Σ = Suc), (SLD462DS1)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und aufgereinigt.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{83}\text{H}_{130}\text{N}_{22}\text{O}_{22}\text{S}]^{2+}$ ($M+2\text{H}$); ber.: 931.5089; gef.: 931.5097.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.

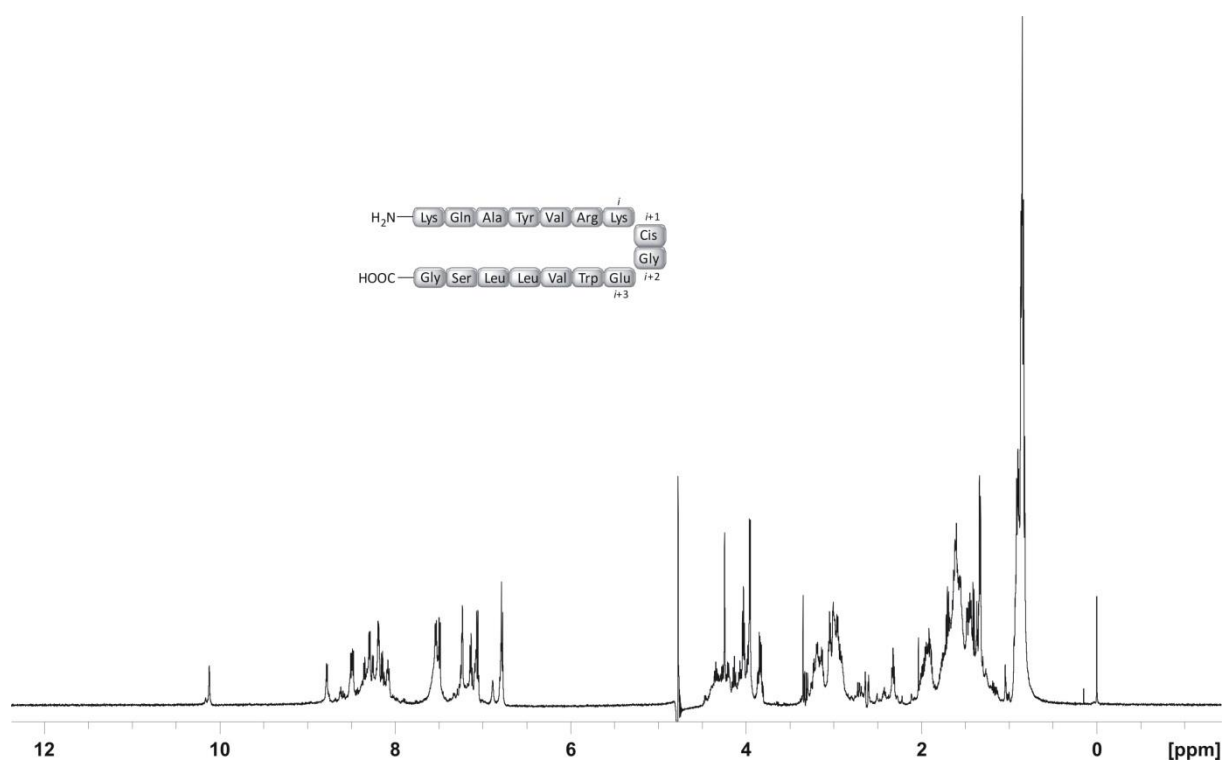


6.8.27 KQAYVRKCis Σ GWVLLSG (188-DS2), (Σ = Suc), (SLD462DS2)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und aufgereinigt.

HR-MS (ESI): für $[C_{83}H_{130}N_{22}O_{22}S]^{2+}$ ($M+2H$); ber.: 931.5089; gef.: 931.5091.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



6.9 Ligation des Foldons

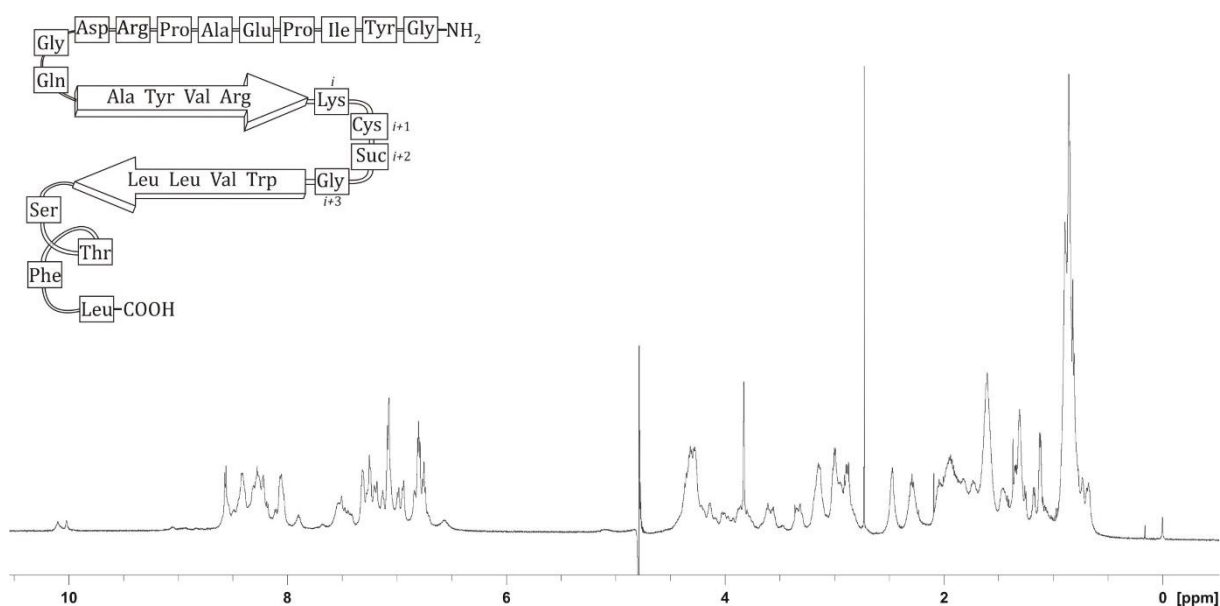
6.9.1 GYIPEAPRDGQAYVRKCEGWLLSTFL (170), (Σ = Suc), (SLD190)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert und Aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 10.87$ min, 10-90% B in 20 min, 0.60 mL/min, ACE 3, C₁₈ 3 μ m, 150x3.0 mm.

HR-MS (ESI): für [C₁₄₀H₂₀₉N₃₅O₃₉S]³⁺ (M+3H); ber.: 1013.5138; gef.: 1013.5127.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



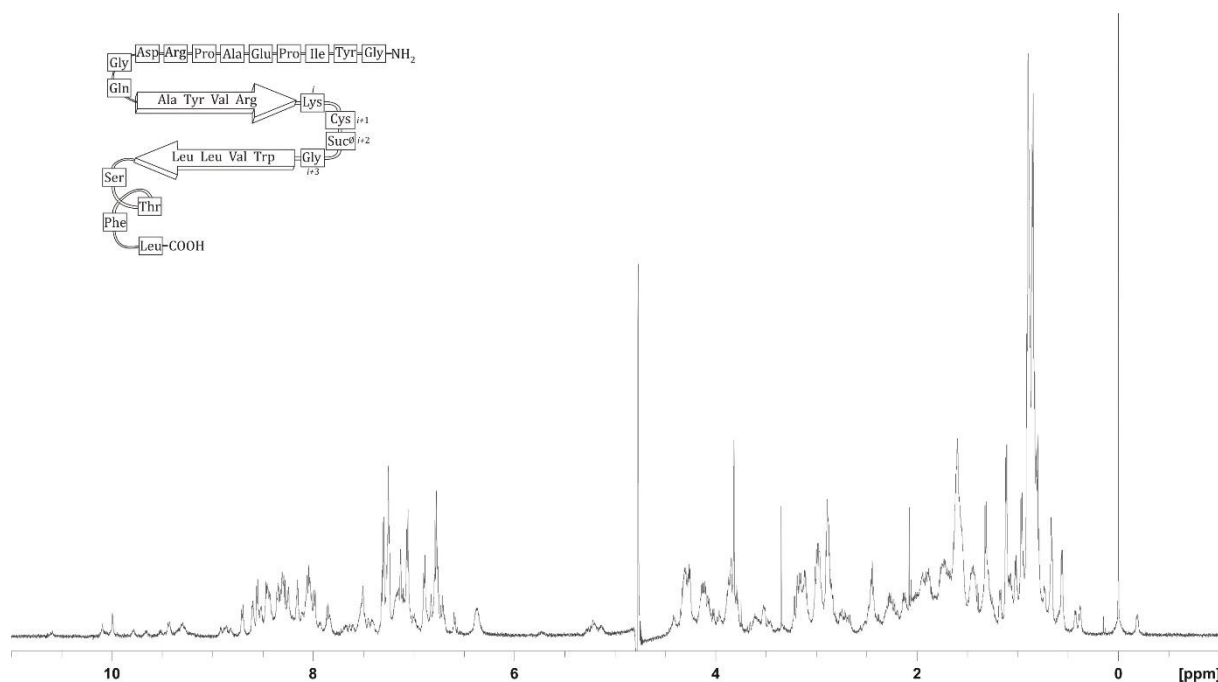
6.9.2 GYIPEAPRDGQAYVRK Σ^0 GWVLLSTFL (171-DS1), (Σ^0 = offenes Suc), (SLD322)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA8** synthetisiert. Das Rohpeptid wurde in 5 mL eines Ammoniumcarbonat-Puffers, der auf pH = 8.7 eingestellt wurde gelöst und für 12 h bei RT rühren gelassen. Das Lösungsmittel wurde durch gefriertrocknen entfernt und der Rückstand mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: t_s = 4.91 min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C₁₈ 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für [C₁₄₀H₂₁₁N₃₅O₄₀S]⁴⁺ (M+4H); ber.: 764.8900; gef.: 764.8896.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



6.10 Festphasensynthese der Pin1 WW Domäne

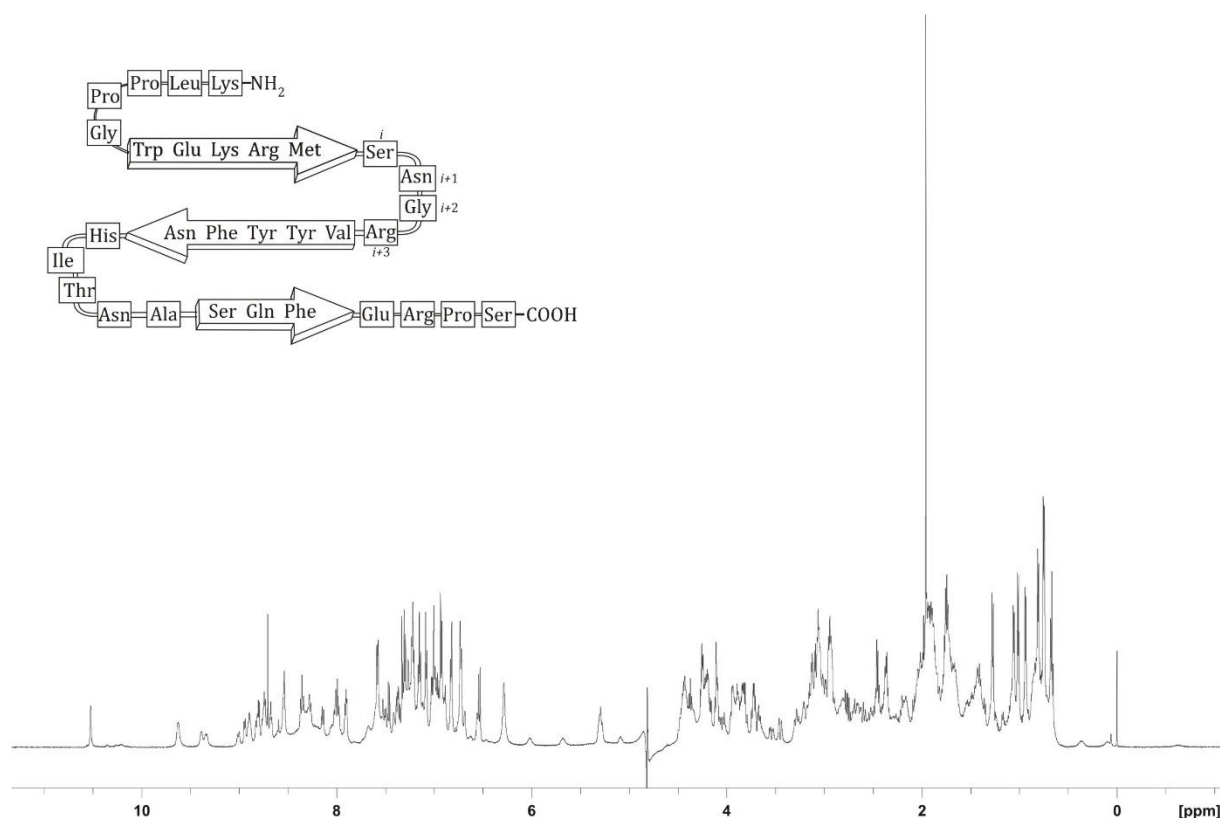
6.10.1 KLPPGWKRMSNGRVVYFNHITNASQFERPS (106), (SLD293)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 4.21$ min, 10-80% B in 5 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C_{18} 3 μ m, 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für $[C_{167}H_{254}N_{49}O_{46}S]^+ (M+5H)$; ber.: 743.1758; gef.: 743.1758.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Experimenteller Teil

Position	Aminosäure	NH	H _α	H _β	andere	
N-term	Lys	-	4.03			
2	Leu	8.79	4.63	1.83	H _γ	1.06
					H _δ	0,82
3	Pro	-	4.91			
4	Pro	-	4.37			
5	Gly	8.75	4.04; 3.19			
6	Trp	7.50	5.09	3.30; 2.99		
7	Glu	9.63	4.84	2.26; 2.17	H _γ	2.71; 2.47
8	Lys	8.90	4.44	1.77	H _γ	1.06
					H _δ	1.66
					H _ε	2.93
9	Arg	8.82	4.48	1.44; 0.37	H _γ	1.30
					H _δ	2.98
10	Met	7.89	4.46	1.96	H _γ	2.47
11	Ser	7.91	4.29	3.84; 3.72		
12	Asn	9.60	4.41	3.09; 2.77		
13	Gly	8.67	4.18; 3.68			
14	Arg	7.99	4.74	2.09; 1.91	H _γ	1.76
					H _δ	3.10
15	Val	8.53	4.60	1.96	H _γ	1.03; 0.77
16	Tyr	8.74	4.75	2.91; 2.65		
17	Tyr	9.00	5.28	2.94; 2.71		
18	Phe	9.33	5.67	3.01; 2.62		
19	Asn	8.34	4.44	2.01; -0.60		
20	His	8.03	4.22	3.54; 3.12		
21	Ile	8.27	3.80	1.94	H _γ	0.83
					CH _{3γ}	0.67
					H _δ	0.76
22	Thr	7.29	4.10	4.25	H _γ	0.95
23	Asn	8.04	4.18	3.13; 2.94		
24	Ala	7.16	4.46	1.27		
25	Ser	8.36	6.00	3.97		
26	Gln	9.36	4.90	2.21	H _γ	2.54
27	Phe	8.88	4.88	3.46; 3.02		
28	Glu	8.14	5.29	1.88	H _γ	2.37
29	Arg	7.21	4.55			
30	Pro	-	3.93			
31	Ser	8.94	4.72	3.85; 3.73		

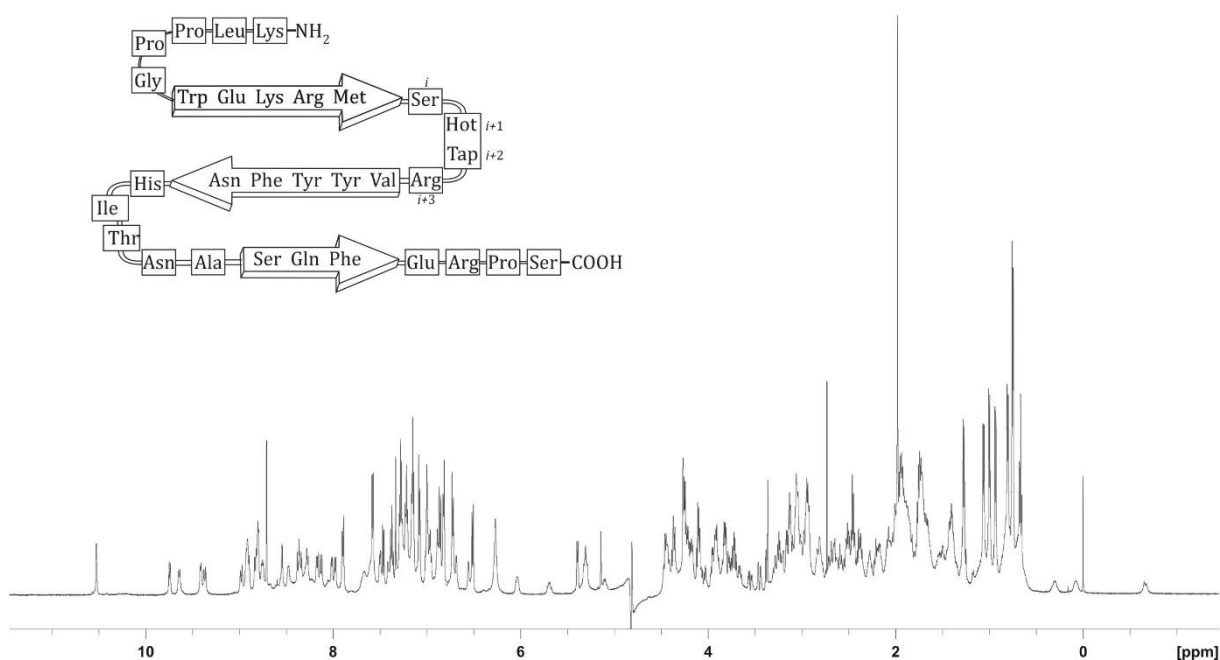
6.10.2 KLPPGWKRMSΨRVYYFNHITNASQFERPS (105), (Ψ = Hot=Tap), (SLD294)

Das Peptid wurde nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA6** mittels automatisierter und mikrowellenunterstützter Festphasensynthese an einem LIBERTY BLUE Peptidsynthesizer in einem 0.10 mmol Ansatz synthetisiert. Die Abspaltung des Peptides vom Harz erfolgte nach der Allgemeinen Arbeitsvorschrift **AA5**. Das Rohpeptid wurde mittels präparativer HPLC aufgereinigt.

HPLC: $t_s = 6.77$ min, 10-90% B in 20 min, 0.45 mL/min, ACE ULTRACORE 2.5, C_{18} 3 μm , 150x2.1 mm.

HR-MS (ESI): für $[\text{C}_{169}\text{H}_{250}\text{N}_{48}\text{O}_{47}\text{S}_2]^{5+}$ ($\text{M}+5\text{H}$); ber.: 754.9701; gef.: 754.9706.

NMR: 600 MHz, 300 K, Kaliumphosphatpuffer (50mM, pH = 3.0)/D₂O 11:1.



Position	Aminosäure	NH	H _α	H _β	andere	
N-term	Lys	-	4.10			
2	Leu	8.78	4.62	1.88	H _γ	1.06
					H _δ	0.82
3	Pro	-	4,95			
4	Pro	-	4.36			
5	Gly	8.75	4.04; 3.19			
6	Trp	7.49	5.09	3.30; 2.97		
7	Glu	9.64	4.86	2.28; 2.18	H _γ	2.72; 2.47
8	Lys	8.89	4.43	1.75	H _γ	1.09
					H _δ	1.67
					H _ε	2.92
9	Arg	8.82	4.46	1.38; 0.30	H _γ	1.29
					H _δ	2.98
					NH _ε	6.88
10	Met	7.89	4.46	1.96	H _δ	2.47
11	Ser	7.90	4.24	3.84; 3.72		
12	Hot	9.74			6H	3.75
13	Tap	-				
14	Arg	8.16	4.74	2.02	H _γ	1.73
					H _δ	3.14
15	Val	8.47	4.69	1.94	H _γ	1.00; 0.75
16	Tyr	8.80	4.76	2.81; 2.64	2,6-H	6.86
					3,5-H	6.51
17	Tyr	8.98	5.30	2.93; 2.65	2,6-H	6.83
					3,5-H	6.72
18	Phe	9.36	5.68	2.99; 2.60	Arom.	7.38
19	Asn	8.34	4.43	2.02; -0.66		
20	His	8.01	4.22	3.54; 3.12		
21	Ile	8.27	3.80	1.92	CH _{3β}	0.66
					H _γ	0.83
					H _δ	0.76
22	Thr	7.27	4.08	4.25	H _γ	0.93
23	Asn	7.97	4.18	3.13; 2.94		
24	Ala	7.14	4.46	1.27		

25	Ser	8.37	6.03	3.97		
26	Gln	9.41	4.93	2.22	H _γ	2.62
27	Phe	8.91	4.86	3.64; 3.04		
28	Glu	8.13	5.30	2.10; 1.86	H _γ	2.53; 2.38
29	Arg	7.20	4.79			
30	Pro	-	3.92			
31	Ser	8.92	4.79	3.84; 3.79		

7. Literaturverzeichnis

- [1] W. Müller-Esterl, *Biochemie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, **2010**.
- [2] M. Schnolzer, S. Kent, *Science* **1992**, 256, 221–225.
- [3] P. Dawson, T. Muir, I. Clark-Lewis, S. Kent, *Science* **1994**, 266, 776–779.
- [4] L. Raibaut, N. Ollivier, O. Melnyk, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, 41, 7001.
- [5] T. Wieland, E. Bokelman, L. Bauer, H. U. Lang, H. Lau, *Liebigs Ann. Chem.* **1953**, 583, 129–148.
- [6] M. Brenner, J. P. Zimmermann, J. Wehrmüller, P. Quitt, I. Photaki, *Experientia* **1955**, 11, 397–399.
- [7] D. Bang, B. L. Pentelute, S. B. H. Kent, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2006**, 45, 3985–3988.
- [8] D. J. Hupe, W. P. Jencks, *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, 99, 451–464.
- [9] P. E. Dawson, M. J. Churchill, M. R. Ghardiri, S. B. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 4325–4329.
- [10] E. C. Johnson, S. B. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 6640–6646.
- [11] T. M. Hackeng, J. H. Griffin, P. E. Dawson, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, 96, 10068–10073.
- [12] S. B. Pollock, S. B. H. Kent, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2342–2344.
- [13] Y. Gui, L. Qiu, Y. Li, H. Li, S. Dong, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, 138, 4890–4899.
- [14] M. M. P. Hinderaker, R. T. R. Raines, *Protein Sci.* **2003**, 12, 1188–1194.
- [15] S. B. Pollock, S. B. H. Kent, *Chem. Commun.* **2011**, 47, 2342–2344.
- [16] M. M. P. Hinderaker, R. T. R. Raines, *Protein Sci.* **2003**, 12, 1188–1194.
- [17] S. Bondalapati, M. Jbara, A. Brik, *Nat. Chem.* **2016**, 8, 407–418.
- [18] K. M. Cergol, R. E. Thompson, L. R. Malins, P. Turner, R. J. Payne, *Org. Lett.* **2014**, 16, 290–293.
- [19] L. R. Malins, R. J. Payne, *Aust. J. Chem.* **2015**, 68, 521–537.
- [20] R. E. Thompson, B. Chan, L. Radom, K. A. Jolliffe, R. J. Payne, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2013**, 52, 9723–9727.
- [21] S. Bondalapati, M. Jbara, A. Brik, *Nat. Chem.* **2016**, 8, 407–418.
- [22] B. Dang, T. Kubota, K. Mandal, F. Bezanilla, S. B. H. Kent, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 11911–11919.
- [23] N. Ollivier, J. Dheur, R. Mhidia, A. Blanpain, O. Melnyk, *Org. Lett.* **2010**, 12, 5238–5241.
- [24] H. Hojo, Y. Onuma, Y. Akimoto, Y. Nakahara, Y. Nakahara, *Tetrahedron Lett.* **2007**, 48, 25–28.

- [25] S. Tsuda, A. Shigenaga, K. Bando, A. Otaka, *Org. Lett.* **2009**, *11*, 823–826.
- [26] T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 3871–3877.
- [27] W. Hou, X. Zhang, F. Li, C. F. Liu, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 386–389.
- [28] J. S. Zheng, H. K. Cui, G. M. Fang, W. A. Xi, L. Liu, *ChemBioChem* **2010**, *11*, 511–515.
- [29] D. Bang, S. B. H. Kent, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43*, 2534–2538.
- [30] Y. Sohma, B. L. Pentelute, J. Whittaker, Q. X. Hua, L. J. Whittaker, M. A. Weiss, S. B. H. Kent, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 1102–1106.
- [31] B. D. Mather, K. Viswanathan, K. M. Miller, T. E. Long, *Prog. Polym. Sci.* **2006**, *31*, 487–531.
- [32] L. F. Fieser, *Arthur Michael*, **1975**.
- [33] A. Michael, *J. für Prakt. Chemie* **1887**, *35*, 349–356.
- [34] C. R. Fenoli, C. N. Bowman, *Chem. Mater* **2014**, *26*, 724–744.
- [35] C. F. H. Allen, W. J. Humphlett, J. O. Fournier, *Can. J. Chem.* **1964**, *42*, 2616–2620.
- [36] A. B. Lowe, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 17–36.
- [37] J. W. Chan, C. E. Hoyle, A. B. Lowe, M. Bowman, *Macromolecules* **2010**, *43*, 6381–6388.
- [38] D. Bensa, J. Rodriguez, *Synth. Commun.* **2004**, *34*, 1515–1533.
- [39] F. Brotzel, B. Kempf, T. Singer, H. Zipse, H. Mayr, *Chem. - A Eur. J.* **2007**, *13*, 336–345.
- [40] R. W. Alder, P. S. Bowman, W. R. S. Steele, D. R. Winterman, *Chem. Commun.* **1968**, 723.
- [41] J. W. Chan, B. Yu, C. E. Hoyle, A. B. Lowe, *Polymer (Guildf)*. **2009**, *50*, 3158–3168.
- [42] J. W. Chan, H. Wei, H. Zhou, C. E. Hoyle, *Eur. Polym. J.* **2009**, *45*, 2717–2725.
- [43] M. Liu, B. H. Tan, R. P. Burford, A. B. Lowe, *Polym. Chem.* **2013**, *4*, 3300.
- [44] G.-Z. Li, R. K. Randev, A. H. Soeriyadi, G. Rees, C. Boyer, Z. Tong, T. P. Davis, C. R. Becer, D. M. Haddleton, *Polym. Chem.* **2010**, *1*, 1196.
- [45] B. Hoppe, J. Martens, *Chemie Unserer Zeit* **2004**, *38*, 73–86.
- [46] D. S. Allgäuer, H. Mayr, *European J. Org. Chem.* **2014**, *2014*, 2956–2963.
- [47] A. J. Sinclair, V. del Amo, D. Philp, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 3308–3318.
- [48] C. P. Mandl, B. König, *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 670–674.
- [49] T. C. Tsao, K. Bailey, *Biochim. Biophys. Acta* **1953**, *11*, 102–113.
- [50] J. E. Moore, W. H. Ward, *J. Am. Chem. Soc.* **1956**, *78*, 2414–2418.
- [51] A. Witter, H. Tuppy, *Biochim. Biophys. Acta* **1960**, *45*, 429–442.
- [52] C. W. Wu, L. R. Yarbrough, *Biochemistry* **1976**, *15*, 2863–2868.
- [53] M. Modesti, *Methods Mol. Biol.* **2011**, *783*, 101–20.

- [54] J. Guy, K. Caron, S. Dufresne, S. W. Michnick, W. G. Skene, J. W. Keillor, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 11969–11977.
- [55] R. Liu, F. J. Sharom, *Biochemistry* **1996**, *35*, 11865–11873.
- [56] H. Schwalbe, K. M. Fiebig, M. Buck, J. A. Jones, S. B. Grimshaw, A. Spencer, S. J. Glaser, L. J. Smith, C. M. Dobson, *Biochemistry* **1997**, *36*, 8977–8991.
- [57] S. Grzesiek, A. Bax, *J. Magn. Reson.* **1992**, *96*, 432–440.
- [58] A. Bax, M. Ikura, *J. Biomol. NMR* **1991**, *1*, 99–104.
- [59] M. E. Ourailidou, J. Y. Van Der Meer, B. J. Baas, M. Jeronimus-Stratingh, A. L. Gottumukkala, G. J. Poelarends, A. J. Minnaard, F. J. Dekker, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 209–212.
- [60] A. Beck, T. Wurch, C. Bailly, N. Corvaia, *Nat. Rev. Immunol.* **2010**, *10*, 345–52.
- [61] S. B. Gunnoo, A. Madder, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 529–553.
- [62] A. Mullard, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2013**, *12*, 483–483.
- [63] J. R. Junutula, K. M. Flagella, R. A. Graham, K. L. Parsons, E. Ha, H. Raab, S. Bhakta, T. Nguyen, D. L. Dugger, G. Li, et al., *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 4769–4778.
- [64] J. R. J. R. Junutula, H. Raab, S. Clark, S. Bhakta, D. D. D. Leipold, S. Weir, Y. Chen, M. Simpson, S. P. S. P. Tsai, M. S. M. S. Dennis, et al., *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 925–32.
- [65] M. Simon, R. Frey, U. Zangemeister-Wittke, A. Plückthun, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 1955–1966.
- [66] L. K. Mosavi, D. L. Minor, Z.-Y. Peng, Z. Peng, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2002**, *99*, 16029–16034.
- [67] M. T. Stumpp, H. K. Binz, P. Amstutz, *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 695–701.
- [68] H. K. Binz, P. Amstutz, A. Plückthun, *Nat. Biotechnol.* **2005**, *23*, 1257–1268.
- [69] C. Zahnd, M. Kawe, M. T. Stumpp, C. De Pasquale, R. Tamaskovic, G. Nagy-Davidescu, B. Dreier, R. Schibli, H. K. Binz, R. Waibel, et al., *Cancer Res.* **2010**, *70*, 1595–1605.
- [70] Y. Wang, Z. Miao, G. Ren, Y. Xu, Z. Cheng, *Chem. Commun. (Camb).* **2014**, *50*, 12832–5.
- [71] M. Gebauer, A. Skerra, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2009**, *13*, 245–255.
- [72] C. J. Anderson, R. Ferdani, *Cancer Biother. Radiopharm.* **2009**, *24*, 379–93.
- [73] Y. Wang, Z. Miao, G. Ren, Y. Xu, Z. Cheng, *Chem. Commun. (Camb).* **2014**, *50*, 12832–5.
- [74] S. Ahlgren, A. Orlova, D. Rosik, M. Sandström, A. Sjöberg, B. Bastrup, O. Widmark, G. Fant, J. Feldwisch, V. Tolmachev, *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 235–243.
- [75] L. C. Radu, J. Y. Yang, J. Kopecek, *Macromol. Biosci.* **2009**, *9*, 36–44.
- [76] R. N. Johnson, P. Kopečková, J. Kopeček, *Biomacromolecules* **2012**, *13*, 727–735.
- [77] F. Danhier, A. Le Breton, V. Préat, *Mol. Pharm.* **2012**, *9*, 2961–2973.
- [78] M.-Y. Tsai, C.-Y. Lin, C.-H. Huang, J.-A. Gu, S.-T. Huang, J. Yu, H.-Y. Chen, *Chem. Commun.* **2012**, *48*, 10969–10971.

- [79] N. Kotagiri, Z. Li, X. Xu, S. Mondal, A. Nehorai, S. Achilefu, *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1272–1281.
- [80] K. C. Koehler, K. S. Anseth, C. N. Bowman, *Biomacromolecules* **2013**, *14*, 538–547.
- [81] T. N. Bansode, J. V. Shelke, V. G. Dongre, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 5094–5098.
- [82] K. D. Hartlen, H. Ismaili, J. Zhu, M. S. Workentin, *Langmuir* **2012**, *28*, 864–871.
- [83] P. Gobbo, M. S. Workentin, *Langmuir* **2012**, *28*, 12357–12363.
- [84] A. Sanchez, E. Pedroso, A. Grandas, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 4364–4367.
- [85] X. Elduque, A. Sanchez, K. Sharma, E. Pedroso, A. Grandas, *Bioconjug. Chem.* **2013**, *24*, 832–839.
- [86] X. Elduque, E. Pedroso, A. Grandas, *Org. Lett.* **2013**, *15*, 2038–2041.
- [87] N. Blom, T. Sicheritz-Pontén, R. Gupta, S. Gammeltoft, S. Brunak, *Proteomics* **2004**, *4*, 1633–1649.
- [88] R. Uy, F. Wold, *Science* **1977**, *198*, 890–896.
- [89] C. T. Walsh, S. Garneau-Tsodikova, G. J. Gatto, *Angew. Chemie* **2005**, *117*, 7508–7539.
- [90] Y. L. Deribe, T. Pawson, I. Dikic, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2010**, *17*, 666–72.
- [91] V. Pejaver, W. L. Hsu, F. Xin, A. K. Dunker, V. N. Uversky, P. Radivojac, *Protein Sci.* **2014**, *23*, 1077–1093.
- [92] J. Seo, K.-J. Lee, *J. Biochem. Mol. Biol.* **2004**, *37*, 35–44.
- [93] S. Ritz-Timme, *Z. Gerontol. Geriatr.* **2001**, *34*, 452–456.
- [94] J. J. Klaene, W. Ni, J. F. Alfaro, Z. S. Zhou, *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 3033–3042.
- [95] M. Mergler, F. Dick, *J. Pept. Sci.* **2005**, *11*, 650–657.
- [96] J. L. Radkiewicz, H. Zipse, S. Clarke, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 3499–3506.
- [97] C. Oliyai, J. P. Patel, L. Carr, R. T. Borchardt, *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* **1994**, *11*, 901–908.
- [98] R. C. Stephenson, S. Clarke, *J. Biol. Chem.* **1989**, *264*, 6164–6170.
- [99] P. Bornstein, G. Balian, *Methods Enzym.* **1977**, *47*, 132–145.
- [100] G. N. Ramachandran, C. Ramakrishnan, V. Sasisekharan, *J. Mol. Biol.* **1963**, *7*, 95–99.
- [101] C. Ramakrishnan, N. Srinivasan, D. Prashanth, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, *29*, 629–637.
- [102] A. A. Kossiakoff, *Science* **1988**, *240*, 191–194.
- [103] H. Tonie Wright, D. W. Urry, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **1991**, *26*, 1–52.
- [104] S. A. Bernhard, A. Berger, J. H. Carter, E. Katchalski, M. Sela, Y. Shalitin, *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 2421–2434.
- [105] L. Mazzarella, S. Capasso, F. Sica, A. Zagari, *Biopolymers* **1989**, *28*, 139–147.

- [106] S. Capasso, F. Sica, A. Zagari, *Peptides* **1987**, 8, 791–796.
- [107] S. Capasso, L. Mazzarella, F. Sica, A. Zagari, *Acta Cryst.* **1987**, C43, 1607–1610.
- [108] L. Mazzarella, I. Schön, F. Sica, A. Zagari, *Acta Crystallogr. Sect. C Cryst. Struct. Commun.* **1988**, 44, 880–882.
- [109] J. B. Ball, N. M. Labrrstory, R. A. Hughes, R. Andrew, **1993**, 49.
- [110] S. Capasso, L. Mazzarella, A. Zagari, *Int. J. Pept. Prorein Res* **1984**, 23, 248–255.
- [111] S. Capasso, P. Sica, A. Zagari, *Int. J. Pept. Prorein Res* **1984**, 24, 588–596.
- [112] C. M. Venkatachalam, *Biopolymers* **1968**, 6, 1425–1436.
- [113] V. J. Hruby, *J. Med. Chem.* **2003**, 46, 4215–4231.
- [114] S. Capasso, L. Mazzarella, F. Sica, A. Zagari, *Int. J. Pept. Prorein Res* **1989**, 33, 124–132.
- [115] S. Noguchi, K. Miyawaki, Y. Satow, *J. Mol. Biol.* **1998**, 278, 231–238.
- [116] S. Kumar, S. Prakash, K. Gupta, A. Dongre, P. Balaram, H. Balaram, *Nat. Commun.* **2016**, 7, 12798.
- [117] E. Dall, J. C. Fegg, P. Briza, H. Brandstetter, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2015**, 54, 2917–2921.
- [118] C. B. Chan, M. Abe, N. Hashimoto, C. Hao, I. R. Williams, X. Liu, S. Nakao, A. Yamamoto, C. Zheng, J. I. Henter, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, 106, 468–473.
- [119] K. Wolk, G. Grütz, K. Witte, H. D. Volk, R. Sabat, *Genes Immun.* **2005**, 6, 452–456.
- [120] K. Tanaka, T. Suzuki, T. Chiba, *Mol. Cells* **1998**, 8, 503–512.
- [121] K. Tabata, H. Ikeda, S. Hashimoto, K. Tabata, H. Ikeda, S. Hashimoto, *J. Bacteriol.* **2005**, 187, 5195–5202.
- [122] J. L. Radkiewicz, H. Zipse, S. Clarke, K. N. Houk, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 9148–9155.
- [123] B. Li, R. T. Borchardt, E. M. Topp, D. VanderVelde, R. L. Schowen, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 11486–11487.
- [124] N. P. Bhatt, K. Patel, R. T. Borchardt, *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* **1990**, 7, 593–599.
- [125] K. Patel, R. T. Borchardt, *Pharm. Res. An Off. J. Am. Assoc. Pharm. Sci.* **1990**, 7, 703–711.
- [126] M. Xie, D. Vander Velde, M. Morton, R. T. Borchardt, R. L. Schowen, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 8955–8956.
- [127] T. Geiger, S. Clarke, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 785–794.
- [128] S. Peptides, R. Tyler-Cross, V. Schirchs, **1991**.
- [129] Y. C. Meinwald, E. R. Stimson, H. A. Scheraga, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1986**, 28, 79–84.
- [130] S. Clarke, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1987**, 30, 808–821.
- [131] L. Athmer, J. Kindrachuk, F. Georges, S. Napper, *J. Biol. Chem.* **2002**, 277, 30502–30507.

- [132] B. Yan, S. Steen, D. Hambly, J. Valliere-Douglass, T. Vanden Bos, S. Smallwood, Z. Yates, T. Arroll, Y. Han, H. Gadgil, et al., *J. Pharm. Sci.* **2009**, 98, 3509–3521.
- [133] P. N. McFadden, S. Clarke, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1982**, 79, 2460–4.
- [134] T. V. Brennan, J. W. Anderson, Z. Jia, E. B. Waygood, S. Clarke, *J. Biol. Chem.* **1994**, 269, 24586–24595.
- [135] C. M. O'Connor, B. J. Germain, *J. Biol. Chem.* **1987**, 262, 10404–10411.
- [136] J. T. Pelton, L. R. McLean, *Anal. Biochem.* **2000**, 277, 167–176.
- [137] K. Wüthrich, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2003**, 42, 3340–3363.
- [138] H. S. Gutowsky, D. W. McCall, C. P. Slichter, *Phys. Rev.* **1951**, 84, 589–590.
- [139] E. L. Hahn, D. E. Maxwell, *Phys. Rev.* **1952**, 88, 1070–1084.
- [140] M. Eberstadt, G. Gemmecker, D. F. Mierke, H. Kessler, *Angew. Chemie* **1995**, 107, 1813–1838.
- [141] M. Karplus, *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, 85, 2870–2871.
- [142] A. C. Wang, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2483–2494.
- [143] L. J. Smith, K. A. Bolin, H. Schwalbe, M. W. MacArthur, J. M. Thornton, C. M. Dobson, *J. Mol. Biol.* **1996**, 255, 494–506.
- [144] H. Kessler, C. Griesinger, K. Wagner, *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, 109, 6927–6933.
- [145] J. Cavanagh, N. J. Skelton, W. J. Fairbrother, M. Rance, A. G. I. Palmer, W. J. Fairbrother, *Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice*, Elsevier Academic Press, London, **2007**.
- [146] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger, *Angew. Chem.* **1988**, 100, 507–554.
- [147] M. Ohnishi, D. W. Urry, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1969**, 36, 194–202.
- [148] T. Cierpicki, J. Otlewski, *J. Biomol. NMR* **2001**, 21, 249–261.
- [149] H. Kessler, *Angew. Chemie Int. Ed. English* **1982**, 21, 512–523.
- [150] N. H. Andersen, J. W. Neidigh, S. M. Harris, G. M. Lee, Z. Liu, H. Tong, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 8547–8561.
- [151] H. Kessler, J. W. Bats, K. Wagner, M. Will, *Biopolymers* **1989**, 28, 385–95.
- [152] A. Aumelas, M. Mangoni, C. Roumestand, L. Chiche, E. Despaux, G. Grassy, B. Calas, A. Chavanieu, *Eur. J. Biochem.* **1967**, 23, 575–583.
- [153] S. Spera, A. Bax, *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, 113, 5490–5492.
- [154] J. L. Markley, D. H. Meadows, O. Jardetzky, *J. Mol. Biol.* **1967**, 27, 25–40.
- [155] A. Nakamura, O. Jardetzky, *Biochemistry* **1968**, 7, 1226–1230.
- [156] Y. Wang, O. Jardetzky, *Protein Sci.* **2002**, 11, 852–861.
- [157] M. A. Jiménez, J. L. Nieto, J. Herranz, M. Rico, J. Santoro, *FEBS Lett.* **1987**, 221, 320–324.

- [158] G. J. Sharman, S. R. Griffiths-Jones, M. Jourdan, M. S. Searle, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 12318–12324.
- [159] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *J. Mol. Biol.* **1991**, *222*, 311–333.
- [160] C. W. Haigh, R. B. Mallion, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **1979**, *13*, 303–344.
- [161] A. Rajagopal, S. Aravinda, S. Raghothama, N. Shamala, P. Balaram, *Biopolymers* **2012**, *98*, 185–194.
- [162] D. C. Dalgarno, B. A. Levine, R. J. P. Williams, *Biosci. Rep.* **1983**, *3*, 443–452.
- [163] D. S. Wishart, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2011**, *58*, 62–87.
- [164] M. L. Tremblay, A. W. Banks, J. K. Rainey, *J. Biomol. NMR* **2010**, *46*, 257–270.
- [165] S. Lenz, Stereodynamik von Succinimid-Thioethern in Der Peptid-Ligation, Philipps-Universität Marburg, **2013**.
- [166] S. Lenz, P. Horx, A. Geyer, *J. Pept. Sci.* **2018**, e3075.
- [167] A. K. Yudin, *Chem. Sci.* **2015**, *6*, 30–49.
- [168] M. Lay, W. Bannwarth, *J. Pept. Sci.* **2015**, *21*, 461–466.
- [169] F. A. Etzkorn, T. Guo, M. A. Lipton, S. D. Goldberg, P. A. Bartlett, *J. Am. Chem. Soc.* **1994**, *116*, 10412–10425.
- [170] R. Schwyzer, J. P. Carrión, B. Gorup, H. Nolting, A. Tun-Kyi, *Helv. Chim. Acta* **1964**, *47*, 441.
- [171] P. Tremmel, A. Geyer, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2004**, *43*, 5789–5791.
- [172] R. Haubner, W. Schmitt, G. Hölzemann, S. L. Goodman, A. Jonczk, H. Kessler, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7881–7891.
- [173] B. Eckhardt, W. Grosse, L.-O. Essen, A. Geyer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 18336–18341.
- [174] P. Balaram, *J. Pept. Res.* **1999**, *54*, 195–9.
- [175] J. S. Richardson, *Adv. Protein Chem.* **1981**, *34*, 167–339.
- [176] C. M. Wilmot, J. M. Thornton, *J. Mol. Biol.* **1988**, *203*, 221–232.
- [177] S. A. Interactions, S. Aravinda, N. Shamala, R. Rajkishore, H. N. Gopi, P. Balaram, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2002**, *41*, 3863–3865.
- [178] C. M. Nair, M. Vijayan, Y. V. Venkatachalapathi, P. Balaram, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1979**, 1183–1184.
- [179] B. Banerji, M. Bhattacharya, R. B. Madhu, S. Kumar Das, J. Iqbal, *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 6473–6477.
- [180] H. E. Stanger, S. H. Gellman, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 4236–4237.
- [181] E. J. Prenner, R. N. A. Lewis, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1999**, *1462*, 201–221.
- [182] J. Swierstra, V. Kapoerchan, A. Knijnenburg, A. van Belkum, M. Overhand, *Eur. J. Clin.*

- Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, 35, 763–769.
- [183] M. Ashrafuzzaman, O. S. Andersen, R. N. McElhaney, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **2008**, 1778, 2814–2822.
- [184] O. Keller, J. Rudinger, C. Acta, *Helv. Chim. Acta* **1975**, 58, 531–541.
- [185] M. Haack, S. Enck, H. Seger, A. Geyer, A. G. Beck-Sickinger, *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, 130, 8326–8336.
- [186] R. M. De Figueiredo, P. Oczipka, R. Fröhlich, M. Christmann, *Synthesis (Stuttg.)* **2008**, 1316–1318.
- [187] P. Reddy, S. Kondo, T. Toru, Y. Ueno, *J. Org. Chem.* **1997**, 62, 2652–2654.
- [188] P. Y. Reddy, S. Kondo, T. Toru, **1997**, 3263, 2652–2654.
- [189] R. Brückner, *Reaktionsmechanismen*, Springer-Spektrum, Heidelberg, **2015**.
- [190] W. T. Grubb, *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, 76, 3408–3414.
- [191] H. Vorbruggen, *Acc. Chem. Res.* **1995**, 28, 509–520.
- [192] X. Elduque, E. Pedroso, A. Grandas, *J. Org. Chem.* **2014**, 79, 2843–2853.
- [193] X. Elduque, A. Sanchez, K. Sharma, E. Pedroso, A. Grandas, *Bioconjug. Chem.* **2013**, 24, 832–839.
- [194] S. Chen, N. E. Fahmi, R. C. Nangreave, Y. Mehellou, S. M. Hecht, *Bioorganic Med. Chem.* **2012**, 20, 2679–2689.
- [195] S. V. Pansare, J. C. Vederas, *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 2311–2316.
- [196] A. Isidro-Llobet, M. Alvarez, F. Albericio, *Chem. Rev.* **2009**, 109, 2455–2504.
- [197] P. Stathopoulos, S. Papas, M. Sakka, A. G. Tzakos, V. Tsikaris, *Amino Acids* **2014**, 46, 1367–1376.
- [198] B. T. Holmes, A. W. Snow, *Tetrahedron* **2005**, 61, 12339–12342.
- [199] K. C. Nicolaou, A. A. Estrada, M. Zak, S. H. Lee, B. S. Safina, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2005**, 44, 1378–1382.
- [200] Molecular Operating Environment (MOE), 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, **2018**.
- [201] S. G. Bartual, J. M. Otero, C. Garcia-Doval, A. L. Llamas-Saiz, R. Kahn, G. C. Fox, M. J. van Raaij, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, 107, 20287–20292.
- [202] F. D'Hérelle, *C. R. Ac. Sci.* **1917**, 165, 373–375.
- [203] M. L. Yap, M. G. Rossmann, *Future Microbiol.* **2014**, 9, 1319–1327.
- [204] A. Letarov, X. Manival, C. Desplats, H. M. Krisch, *J. Bacteriol.* **2005**, 187, 1055–1066.
- [205] S. P. Boudko, S. V. Strelkov, J. Engel, J. Stetefeld, *J. Mol. Biol.* **2004**, 339, 927–935.
- [206] V. B. Rao, L. W. Black, *Virol. J.* **2010**, 7, 1–14.

- [207] S. Meier, S. Güthe, T. Kiefhaber, S. Grzesiek, *J. Mol. Biol.* **2004**, *344*, 1051–1069.
- [208] J. Habazettl, A. Reiner, T. Kiefhaber, *J. Mol. Biol.* **2009**, *389*, 103–114.
- [209] M. Körling, A. Geyer, *European J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 2382–2387.
- [210] M. Körling, A. Geyer, *European J. Org. Chem.* **2015**, *2015*, 6448–6457.
- [211] A. G. Cochran, N. J. Skelton, M. A. Starovasnik, *Proc Natl Acad Sci U S A* **2001**, *98*, 5578–5583.
- [212] M. Körling, B-Turns Jenseits Natürlicher Limitierungen, Philipps-Universität Marburg, **2015**.
- [213] B. Eckhardt, Synthetische Dipeptidbausteine Zur Stabilisierung Der Struktur von Proteinen, Philipps-Universität Marburg, **2009**.
- [214] H. Andersson, E. Danelius, P. Jarvoll, S. Niebling, A. J. Hughes, S. Westenhoff, U. Brath, M. Erdélyi, *ACS omega* **2017**, *2*, 508–516.
- [215] S. Honda, N. Kobayashi, E. Munekata, *J. Mol. Biol.* **2000**, *295*, 269–278.
- [216] S. R. Griffiths-Jones, M. S. Searle, *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 8350–8356.
- [217] A. Bundi, K. Wüthrich, *Biopolymers* **1979**, *18*, 285–297.
- [218] L. J. Smith, K. M. Fiebig, H. Schwalbe, C. M. Dobson, *Fold. Des.* **1996**, *1*, R95–R106.
- [219] D. S. Wishart, C. G. Bigam, A. Holm, R. S. Hodges, B. D. Sykes, *J. Biomol. NMR* **1995**, *5*, 67–81.
- [220] B. Odaert, F. Jean, C. Boutillon, E. Buisine, O. Melnyk, a Tartar, G. Lippens, *Protein Sci.* **1999**, *8*, 2773–83.
- [221] A. a Fuller, D. Du, F. Liu, J. E. Davoren, G. Bhabha, G. Kroon, D. a Case, H. J. Dyson, E. T. Powers, P. Wipf, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 11067–11072.
- [222] R. V Nair, S. B. Baravkar, T. S. Ingole, G. J. Sanjayan, *Chem. Commun. (Camb).* **2014**, *50*, 13874–84.
- [223] A. B. Sibley, M. Cosman, V. V Krishnan, *Biophys. J.* **2003**, *84*, 1223–1227.
- [224] S. P. Mielke, V. V. Krishnan, *Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc.* **2009**, *54*, 141–165.
- [225] S. Schwarzinger, G. J. A. Kroon, T. R. Foss, J. Chung, P. E. Wright, H. J. Dyson, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 2970–2978.
- [226] D. S. Wishart, B. D. Sykes, F. M. Richards, *Biochemistry* **1992**, *31*, 1647–1651.
- [227] C.-C. Wang, W.-C. Lai, W.-J. Chuang, *J. Biomol. NMR* **2014**, *59*, 175–184.
- [228] M. Jäger, Y. Zhang, J. Bieschke, H. Nguyen, M. Dendle, M. E. Bowman, J. P. Noel, M. Gruebele, J. W. Kelly, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 10648–53.
- [229] X. I. N. Jiang, J. Kowalski, J. W. Kelly, *Protein Sci.* **2001**, *10*, 1454–1465.
- [230] J. A. Kowalski, K. Liu, J. W. Kelly, *Biopolymers* **2002**, *63*, 111–121.
- [231] G. Yang, C. Sau, W. Lai, J. Cichon, W. Li, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 11420–11427.

- [232] R. Kaul, A. R. Angeles, M. Jäger, E. T. Powers, J. W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 5206–5212.
- [233] H. I. Chen, A. Einbond, S. J. Kwak, H. Linn, E. Koepf, S. Peterson, J. W. Kelly, M. Sudol, *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 17070–17077.
- [234] W. Chen, S. Enck, J. L. Price, D. L. Powers, E. T. Powers, C. H. Wong, H. J. Dyson, J. W. Kelly, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 9877–9884.
- [235] M. J. Macias, M. Hyvönen, E. Baraldi, J. Schultz, M. Sudol, M. Saraste, H. Oschkinat, *Nature* **1996**, *382*, 646–649.
- [236] R. S. Hodges, R. B. Merrifield, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1974**, *6*, 397–405.
- [237] F. Lefèvre, M. H. Rémy, J. M. Masson, *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 447–448.
- [238] B. C. Cunningham, J. a Wells, *Science* **1989**, *244*, 1081–1085.
- [239] K. L. Morrison, G. A. Weiss, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2001**, *5*, 302–307.
- [240] M. T. H. Howlader, Y. Kagawa, A. Miyakawa, A. Yamamoto, T. Taniguchi, T. Hayakawa, H. Sakai, *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 860–865.
- [241] S. M. Simonsen, L. Sando, K. J. Rosengren, C. K. Wang, M. L. Colgrave, N. L. Daly, D. J. Craik, *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 9805–9813.
- [242] P. Grieco, P. M. Balse, D. Weinberg, T. MacNeil, V. J. Hruby, *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 4998–5002.
- [243] M. D. Simon, Y. Maki, A. A. Vinogradov, C. Zhang, H. Yu, Y. S. Lin, Y. Kajihara, B. L. Pentelute, *J. Am. Chem. Soc.* **2016**, *138*, 12099–12111.
- [244] H. Kessler, R. Gratias, G. Hessler, M. Gurrath, G. Müller, *Pure Appl. Chem* **1996**, *68*, 1201–1205.
- [245] J. Chatterjee, B. Laufer, H. Kessler, *Nat. Protoc.* **2012**, *7*, 432–444.
- [246] A. Schrimpf, A. Geyer, *ChemBioChem* **2016**, *17*, 2129–2132.
- [247] N. E. Zhou, B. Y. Zhu, B. D. Sykes, R. S. Hodges, *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, *114*, 4320–4326.
- [248] N. J. Baxter, M. P. Williamson, *J. Biomol. NMR* **1997**, *9*, 359–369.
- [249] C. Toniolo, M. Crisma, A. Moretto, C. Peggion, F. Formaggio, C. Alemán, C. Cativiela, C. Ramakrishnan, P. Balaram, *Chem. - A Eur. J.* **2015**, *21*, 13866–13877.
- [250] C. Chothia, *J. Mol. Biol.* **1983**, *163*, 107–17.
- [251] K. Fujiwara, S. Ebisawa, Y. Watanabe, H. Fujiwara, M. Ikeguchi, *BMC Struct. Biol.* **2015**, *15*, 1–12.
- [252] M. Levitt, *J. Mol. Biol.* **1976**, *104*, 59–107.
- [253] E. J. Milner-White, L. H. Bell, P. H. Maccallum, *J. Mol. Biol.* **1992**, *228*, 725–734.
- [254] A. K. Pandey, D. Naduthambi, K. M. Thomas, N. J. Zondlo, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4333–4363.
- [255] S. A. Cadamuro, R. Reichold, U. Kusebauch, H. Musiol, C. Renner, P. Tavan, L. Moroder,

- Angew. Chemie - Int. Ed.* **2008**, *47*, 2143–2146.
- [256] C. Isomerism, P. Residues, J. F. Brandts, H. R. Halvorson, M. Brennan, *Biochemistry* **1975**, *14*, 4953–4963.
- [257] E. Beausoleil, R. Sharma, S. W. Michnick, W. D. Lubell, *J. Org. Chem.* **1998**, *3263*, 6572–6578.
- [258] M. Keller, P. Dumy, M. Schutkowski, G. S. Fischer, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *7863*, 2714–2720.
- [259] C. Renner, S. Alefelder, J. H. Bae, N. Budisa, R. Huber, L. Moroder, *Angew. Chem.* **2001**, *113*, 949–951.
- [260] D. Gani, A. Lewis, T. Rutherford, J. Wilkie, I. Stirling, T. Jenn, M. D. Ryan, *Tetrahedron* **1998**, *54*, 15793–15819.
- [261] M. D. Shoulders, K. A. Satyshur, K. T. Forest, R. T. Raines, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 559–564.
- [262] M. D. Shoulders, J. A. Hodges, R. T. Raines, **2006**, 8112–8113.
- [263] S. A. Kolodziej, G. V. Nikiforovich, R. Skeeane, M. F. Lignon, J. Martinez, G. R. Marshall, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 137–149.
- [264] H. Ding, A. Shigenaga, K. Sato, K. Morishita, A. Otaka, *Org. Lett.* **2011**, *13*, 5588–5591.
- [265] P. Sieber, *Helv. Chim. Acta* **1977**, *60*, 2711–2716.
- [266] G. P. Kumar, D. Rambabu, M. V. B. Rao, M. Pal, *J. Chem.* **2013**, *2013*.
- [267] A. J. Brouwer, M. C. F. Monnee, R. M. J. Liskamp, *Synthesis (Stuttg.)* **2000**, *2000*, 1579–1584.
- [268] V. Diaz-Rodriguez, E. Ganusova, T. M. Rappe, J. M. Becker, M. D. Distefano, *J. Org. Chem.* **2015**, *80*, 11266–11274.
- [269] S. D. Fontaine, R. Reid, L. Robinson, G. W. Ashley, D. V. Santi, *Bioconjug. Chem.* **2015**, *26*, 145–152.
- [270] L. N. Tumey, M. Charati, T. He, E. Sousa, D. Ma, X. Han, T. Clark, J. Casavant, F. Loganzo, F. Barletta, et al., *Bioconjug. Chem.* **2014**, *25*, 1871–1880.
- [271] A. C. Conibear, S. Chaousis, T. Durek, K. Johan Rosengren, D. J. Craik, C. I. Schroeder, *Biopolymers* **2016**, *106*, 89–100.
- [272] J. A. Robinson, S. DeMarco, F. Gombert, K. Moehle, D. Obrecht, *Drug Discov. Today* **2008**, *13*, 944–951.
- [273] T. A. Hill, N. E. Shepherd, F. Diness, D. P. Fairlie, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 13020–13041.
- [274] G. L. Verdine, G. J. Hilinski, *Stapled Peptides for Intracellular Drug Targets*, Elsevier Inc., **2012**.
- [275] V. J. Hruby, *Nat. Rev. Drug Discov.* **2002**, *1*, 847–858.
- [276] L. Gentilucci, R. De Marco, L. Cerisoli, *Curr. Pharm. Des.* **2010**, *16*, 3185–3203.

- [277] R. J. Clark, H. Fischer, L. Dempster, N. L. Daly, K. J. Rosengren, S. T. Nevin, F. A. Meunier, D. J. Adams, D. J. Craik, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 13767–13772.
- [278] M. Morishita, N. A. Peppas, *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 905–910.
- [279] C. K. Wang, C. W. Gruber, M. Cemazar, C. Siatskas, P. Tagore, N. Payne, G. Sun, S. Wang, C. C. Bernard, D. J. Craik, *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 156–163.
- [280] G. J. M. Pruijn, A. Wiik, W. J. van Venrooij, *Arthritis Res. Ther.* **2010**, *12*, 1–8.
- [281] W. J. Van Venrooij, G. J. M. Pruijn, *Arthritis Res.* **2000**, 2–4.
- [282] G. A. Schellekens, *J. Clin. Invest.* **1998**, *101*, 273–281.
- [283] P. Taylor, J. Gartemann, J. Hsieh, J. Creeden, *Autoimmune Dis.* **2011**, *2011*, 1–18.
- [284] E. Szarka, F. Babos, A. Magyar, K. Huber, Z. Szittner, K. Papp, J. Prechl, J. Pozsgay, Z. Neer, M. Ádori, et al., *Immunology* **2014**, *141*, 181–191.
- [285] A. Schrimpf, Formstabile Peptid epitope für die personalisierte Diagnostik der Rheumatoiden Arthritis, Philipps-Universität Marburg, **2018**.
- [286] S. Fischer, A. Geyer, *Angew. Chemie - Int. Ed.* **2014**, *53*, 3849–3853.
- [287] S. Fischer, β -hairpin-Peptide zur Erkennung von Antikörpern gegen Rheumatoide Arthritis, Philipps-Universität Marburg, **2015**.
- [288] F. R. Salemme, *Nature* **1982**, *299*, 754–756.
- [289] A. N. Kravchenko, E. Y. Maksareva, P. A. Belyakov, A. S. Sigachev, K. Y. Chegaev, K. A. Lyssenko, O. V. Lebedev, N. N. Makhova, *Russ. Chem. Bull.* **2003**, *52*, 192–197.
- [290] R. Hetzel, K. Wüthrich, *Biopolymers* **1979**, *18*, 2589–2606.
- [291] D. Hübner, B. Hartrodt, E. Kleinpeter, D. Ströhl, W. Brandt, H. Schinke, M. Wahab, G. Fischer, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1991**, *177*, 271–278.
- [292] P. Craveur, A. P. Joseph, P. Poulain, A. G. De Brevern, J. Rebehmed, *Amino Acids* **2013**, *45*, 279–289.
- [293] M. Pohl, Studien zur Synthese unnatürlicher Thioaminosäuren für die Fastphasenpeptidsynthese, Philipps-Universität Marburg, **2016**.
- [294] A. C. Gibbs, T. C. Bjorndahl, R. S. Hodges, D. S. Wishart, *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 1203–1213.
- [295] A. Schrimpf, U. Linne, A. Geyer, *Org. Biomol. Chem.* **2017**, *15*, 2512–2521.
- [296] E. Ilyina, V. Roongta, K. H. Mayo, *Biochemistry* **1997**, *36*, 5245–5250.

8. Anhang

Kristallographische Daten zu SLD361:

Data was collected with an STOE STADIVARI diffractometer equipped with with CuK_α radiation, a graded multilayer mirror monochromator ($\lambda = 1.54186 \text{ \AA}$) and a DECTRIS PILATUS 300K detector using an oil-coated shock-cooled crystal at 100(2) K. Absorption effects were corrected semi-empirical using multiscanned reflexions (X-Area LANA 1.68.2.0 (STOE, 2016)). Cell constants were refined using 20458 of observed reflections of the data collection. The structure was solved by direct methods by using the program XT V2014/1 (Bruker AXS Inc., 2014) and refined by full matrix least squares procedures on F^2 using SHELXL-2017/1 (Sheldrick, 2017). The non-hydrogen atoms have been refined anisotropically, carbon bonded hydrogen atoms were included at calculated positions and refined using the 'riding model' with isotropic temperature factors at 1.2 times (for CH_3 groups 1.5 times) that of the preceding carbon atom. CH_3 groups were allowed to rotate about the bond to their next atom to fit the electron density. The absolute structure has been determined. The Flack parameter refined to 0.00(2).

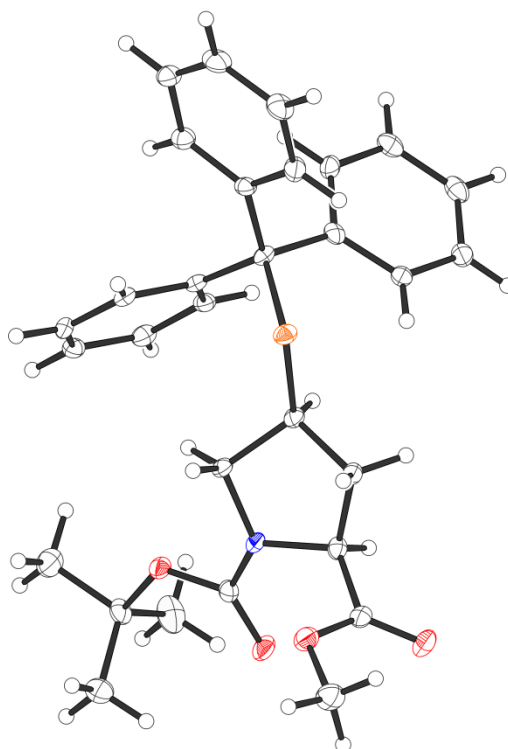


Table 1. Crystal data and structure refinement for SLD361.

Crystal data		
Identification code	SLD361	
Habitus, colour	needle, colourless	
Crystal size	0.44 x 0.08 x 0.05 mm ³	
Crystal system	Monoclinic	
Space group	P2 ₁	Z = 2
Unit cell dimensions	a = 11.8676(7) Å	α = 90°.
	b = 7.5714(3) Å	β = 98.828(5)°.
	c = 14.9878(9) Å	γ = 90°.
	1330.77(13) Å ³	
Volume	1330.77(13) Å ³	
Cell determination	20458 peaks with Theta 3.0 to 71.9°.	
Empirical formula	C ₃₀ H ₃₃ N O ₄ S	
Moiety formula	C ₃₀ H ₃₃ N O ₄ S	
Formula weight	503.63	
Density (calculated)	1.257 Mg/m ³	
Absorption coefficient	1.364 mm ⁻¹	
F(000)	536	
Data collection:		
Diffractionmeter type	STOE STADIVARI	
Wavelength	1.54186 Å	
Temperature	100(2) K	
Theta range for data collection	2.984 to 71.737°.	
Index ranges	-14<=h<=14, -8<=k<=9, -10<=l<=18	
Data collection software	X-Area Pilatus3_SV 1.31.127.0 (STOE, 2016) ^[1]	
Cell refinement software	X-Area Recipe 1.33.0.0 (STOE, 2015) ^[2]	
Data reduction software	X-Area Integrate 1.71.0.0 (STOE, 2016) ^[3]	
	X-Area LANA 1.68.2.0 (STOE, 2016) ^[4]	
Solution and refinement:		
Reflections collected	13449	
Independent reflections	5000 [R(int) = 0.0292]	
Completeness to theta = 67.686°	99.9 %	
Observed reflections	4711[I > 2σ(I)]	
Reflections used for refinement	5000	
Absorption correction	Semi-empirical from equivalents ^[4]	
Max. and min. transmission	0.8199 and 0.1635	
Flack parameter (absolute struct.)	0.00(2) ^[5]	
Largest diff. peak and hole	0.384 and -0.278 e.Å ⁻³	
Solution	intrinsic phases ^[6]	
Refinement	Full-matrix least-squares on F ² ^[7]	
Treatment of hydrogen atoms	Calculated positions, constr. ref.	
Programs used	XT V2014/1 (Bruker AXS Inc., 2014) ^[6]	
	SHELXL-2017/1 (Sheldrick, 2017) ^[7]	
	DIAMOND (Crystal Impact) ^[8]	
	ShelXle (Hübschle, Sheldrick, Dittrich, 2011) ^[9]	
Data / restraints / parameters	5000 / 1 / 329	
Goodness-of-fit on F ²	1.047	
R index (all data)	wR2 = 0.1147	
R index conventional [I>2sigma(I)]	R1 = 0.0424	

Table 2. Atomic coordinates and equivalent isotropic displacement parameters (\AA^2) for SLD361. $U(\text{eq})$ is defined as one third of the trace of the orthogonalized U^{ij} tensor.

	x	y	z	$U(\text{eq})$	Occupancy
S1	0.64340(6)	0.48995(10)	0.32329(5)	0.01564(19)	1
O1	0.4173(2)	0.1383(3)	-0.00829(15)	0.0218(5)	1
O2	0.3570(2)	0.0570(3)	0.11989(15)	0.0199(5)	1
O3	0.18801(19)	0.4214(4)	0.06155(15)	0.0230(5)	1
O4	0.18248(18)	0.5444(3)	0.19994(14)	0.0170(5)	1
N3	0.3405(2)	0.4092(4)	0.17163(16)	0.0147(5)	1
C1	0.3940(3)	0.1737(4)	0.0645(2)	0.0156(6)	1
C2	0.4153(3)	0.3554(4)	0.1067(2)	0.0143(6)	1
C4	0.4056(2)	0.4656(4)	0.25863(19)	0.0148(6)	1
C5	0.5233(2)	0.5041(4)	0.23291(18)	0.0139(6)	1
C6	0.5349(3)	0.3613(4)	0.16242(19)	0.0150(6)	1
C7	0.2321(3)	0.4565(4)	0.1383(2)	0.0159(7)	1
C8	0.3513(3)	-0.1238(5)	0.0871(2)	0.0248(8)	1
C9	0.0639(3)	0.6134(5)	0.1768(2)	0.0193(7)	1
C10	-0.0179(3)	0.4598(6)	0.1576(2)	0.0283(8)	1
C11	0.0561(3)	0.7431(6)	0.0984(3)	0.0315(9)	1
C12	0.0474(3)	0.7091(5)	0.2629(2)	0.0263(8)	1
C13	0.6648(3)	0.7221(4)	0.36101(19)	0.0135(6)	1
C14	0.5484(3)	0.7877(4)	0.3792(2)	0.0141(6)	1
C15	0.4979(3)	0.7095(4)	0.44847(19)	0.0148(6)	1
C16	0.3888(3)	0.7550(4)	0.4615(2)	0.0171(7)	1
C17	0.3257(3)	0.8778(4)	0.4048(2)	0.0171(7)	1
C18	0.3740(3)	0.9546(4)	0.3359(2)	0.0174(7)	1
C19	0.4850(3)	0.9122(4)	0.32377(19)	0.0146(6)	1
C20	0.7142(2)	0.8384(4)	0.2914(2)	0.0142(6)	1
C21	0.7226(2)	0.7846(5)	0.2043(2)	0.0163(6)	1
C22	0.7638(3)	0.8979(5)	0.1437(2)	0.0196(7)	1
C23	0.7994(3)	1.0667(5)	0.1700(2)	0.0202(7)	1
C24	0.7931(3)	1.1227(5)	0.2574(2)	0.0187(7)	1
C25	0.7509(2)	1.0095(5)	0.3171(2)	0.0172(6)	1
C26	0.7560(3)	0.7089(4)	0.4460(2)	0.0148(6)	1
C27	0.7465(3)	0.8006(4)	0.5247(2)	0.0171(6)	1
C28	0.8312(3)	0.7879(5)	0.5997(2)	0.0208(7)	1
C29	0.9265(3)	0.6826(5)	0.5967(2)	0.0240(8)	1
C30	0.9385(3)	0.5944(5)	0.5181(2)	0.0223(7)	1
C31	0.8542(3)	0.6084(5)	0.4427(2)	0.0199(7)	1

Table 3. Bond lengths [Å] and angles [°] for SLD361.

S1-C5	1.812(3)	C13-C14	1.532(4)
S1-C13	1.852(3)	C13-C26	1.542(4)
O1-C1	1.197(4)	C13-C20	1.548(4)
O2-C1	1.332(4)	C14-C19	1.397(4)
O2-C8	1.452(4)	C14-C15	1.406(4)
O3-C7	1.218(4)	C15-C16	1.382(5)
O4-C7	1.345(4)	C15-H15	0.9500
O4-C9	1.492(4)	C16-C17	1.397(5)
N3-C7	1.356(4)	C16-H16	0.9500
N3-C2	1.472(4)	C17-C18	1.383(5)
N3-C4	1.473(4)	C17-H17	0.9500
C1-C2	1.519(5)	C18-C19	1.395(4)
C2-C6	1.534(4)	C18-H18	0.9500
C2-H2	1.0000	C19-H19	0.9500
C4-C5	1.533(4)	C20-C21	1.386(4)
C4-H4A	0.9900	C20-C25	1.402(5)
C4-H4AB	0.9900	C21-C22	1.391(5)
C5-C6	1.532(4)	C21-H21	0.9500
C5-H5	1.0000	C22-C23	1.385(5)
C6-H6A	0.9900	C22-H22	0.9500
C6-H6AB	0.9900	C23-C24	1.390(5)
C8-H8A	0.9800	C23-H23	0.9500
C8-H8AB	0.9800	C24-C25	1.386(5)
C8-H8AC	0.9800	C24-H24	0.9500
C9-C10	1.513(5)	C25-H25	0.9500
C9-C12	1.519(5)	C26-C27	1.388(4)
C9-C11	1.523(5)	C26-C31	1.399(5)
C10-H10A	0.9800	C27-C28	1.392(4)
C10-H10B	0.9800	C27-H27	0.9500
C10-H10C	0.9800	C28-C29	1.389(5)
C11-H11A	0.9800	C28-H28	0.9500
C11-H11B	0.9800	C29-C30	1.382(5)
C11-H11C	0.9800	C29-H29	0.9500
C12-H12A	0.9800	C30-C31	1.393(5)
C12-H12B	0.9800	C30-H30	0.9500
C12-H12C	0.9800	C31-H31	0.9500
C5-S1-C13	103.15(14)	C4-C5-S1	116.31(19)
C1-O2-C8	114.6(2)	C6-C5-H5	109.4
C7-O4-C9	120.7(2)	C4-C5-H5	109.4
C7-N3-C2	117.7(2)	S1-C5-H5	109.4
C7-N3-C4	126.0(3)	C5-C6-C2	102.9(2)
C2-N3-C4	112.3(2)	C5-C6-H6A	111.2
O1-C1-O2	124.3(3)	C2-C6-H6A	111.2
O1-C1-C2	122.4(3)	C5-C6-H6AB	111.2
O2-C1-C2	113.1(2)	C2-C6-H6AB	111.2
N3-C2-C1	116.6(3)	H6A-C6-H6AB	109.1
N3-C2-C6	103.5(2)	O3-C7-O4	125.9(3)
C1-C2-C6	109.5(3)	O3-C7-N3	122.4(3)
N3-C2-H2	109.0	O4-C7-N3	111.6(3)
C1-C2-H2	109.0	O2-C8-H8A	109.5
C6-C2-H2	109.0	O2-C8-H8AB	109.5
N3-C4-C5	101.9(2)	H8A-C8-H8AB	109.5
N3-C4-H4A	111.4	O2-C8-H8AC	109.5
C5-C4-H4A	111.4	H8A-C8-H8AC	109.5
N3-C4-H4AB	111.4	H8AB-C8-H8AC	109.5
C5-C4-H4AB	111.4	O4-C9-C10	109.2(3)
H4A-C4-H4AB	109.2	O4-C9-C12	102.1(2)
C6-C5-C4	102.8(2)	C10-C9-C12	111.4(3)

C6-C5-S1	109.3(2)	O4-C9-C11	110.4(3)
C10-C9-C11	112.8(3)	C19-C18-H18	119.7
C12-C9-C11	110.3(3)	C18-C19-C14	120.7(3)
C9-C10-H10A	109.5	C18-C19-H19	119.6
C9-C10-H10B	109.5	C14-C19-H19	119.6
H10A-C10-H10B	109.5	C21-C20-C25	117.8(3)
C9-C10-H10C	109.5	C21-C20-C13	123.9(3)
H10A-C10-H10C	109.5	C25-C20-C13	118.3(3)
H10B-C10-H10C	109.5	C20-C21-C22	121.1(3)
C9-C11-H11A	109.5	C20-C21-H21	119.4
C9-C11-H11B	109.5	C22-C21-H21	119.4
H11A-C11-H11B	109.5	C23-C22-C21	120.4(3)
C9-C11-H11C	109.5	C23-C22-H22	119.8
H11A-C11-H11C	109.5	C21-C22-H22	119.8
H11B-C11-H11C	109.5	C22-C23-C24	119.4(3)
C9-C12-H12A	109.5	C22-C23-H23	120.3
C9-C12-H12B	109.5	C24-C23-H23	120.3
H12A-C12-H12B	109.5	C25-C24-C23	119.8(3)
C9-C12-H12C	109.5	C25-C24-H24	120.1
H12A-C12-H12C	109.5	C23-C24-H24	120.1
H12B-C12-H12C	109.5	C24-C25-C20	121.5(3)
C14-C13-C26	114.3(2)	C24-C25-H25	119.3
C14-C13-C20	112.4(2)	C20-C25-H25	119.3
C26-C13-C20	107.7(2)	C27-C26-C31	118.6(3)
C14-C13-S1	106.1(2)	C27-C26-C13	122.1(3)
C26-C13-S1	103.7(2)	C31-C26-C13	119.3(3)
C20-C13-S1	112.5(2)	C26-C27-C28	120.6(3)
C19-C14-C15	118.2(3)	C26-C27-H27	119.7
C19-C14-C13	122.1(3)	C28-C27-H27	119.7
C15-C14-C13	119.5(3)	C29-C28-C27	120.3(3)
C16-C15-C14	120.9(3)	C29-C28-H28	119.9
C16-C15-H15	119.6	C27-C28-H28	119.9
C14-C15-H15	119.6	C30-C29-C28	119.7(3)
C15-C16-C17	120.4(3)	C30-C29-H29	120.1
C15-C16-H16	119.8	C28-C29-H29	120.1
C17-C16-H16	119.8	C29-C30-C31	120.0(3)
C18-C17-C16	119.3(3)	C29-C30-H30	120.0
C18-C17-H17	120.4	C31-C30-H30	120.0
C16-C17-H17	120.4	C30-C31-C26	120.8(3)
C17-C18-C19	120.5(3)	C30-C31-H31	119.6
C17-C18-H18	119.7	C26-C31-H31	119.6

Symmetry transformations used to generate equivalent atoms:

Table 4. Anisotropic displacement parameters (\AA^2) for SLD361.
The anisotropic displacement factor exponent takes the form: $-2\pi^2[h^2 a^{*2}U^{11} + \dots + 2 h k a^* b^* U^{12}]$

	U^{11}	U^{22}	U^{33}	U^{23}	U^{13}	U^{12}
S1	0.0145(3)	0.0179(4)	0.0134(3)	-0.0014(3)	-0.0015(2)	0.0011(3)
O1	0.0288(13)	0.0230(12)	0.0142(11)	-0.0038(9)	0.0051(9)	0.0003(10)
O2	0.0245(12)	0.0185(11)	0.0168(11)	-0.0016(9)	0.0035(9)	-0.0031(10)
O3	0.0167(11)	0.0398(14)	0.0116(11)	-0.0058(10)	-0.0002(8)	0.0028(10)
O4	0.0127(10)	0.0246(12)	0.0129(10)	-0.0028(9)	-0.0002(8)	0.0022(9)
N3	0.0153(12)	0.0193(13)	0.0097(12)	-0.0033(10)	0.0021(9)	-0.0008(11)
C1	0.0117(14)	0.0214(16)	0.0127(15)	-0.0008(12)	-0.0015(11)	0.0035(12)
C2	0.0150(15)	0.0164(15)	0.0119(13)	0.0012(11)	0.0030(11)	0.0012(12)
C4	0.0129(13)	0.0209(17)	0.0101(13)	-0.0032(12)	-0.0003(10)	0.0000(13)
C5	0.0137(13)	0.0178(15)	0.0097(13)	0.0003(12)	0.0001(10)	0.0005(13)
C6	0.0135(14)	0.0191(15)	0.0122(14)	-0.0010(12)	0.0020(11)	0.0011(12)
C7	0.0147(14)	0.0207(18)	0.0125(14)	0.0016(11)	0.0031(11)	-0.0024(12)
C8	0.0299(19)	0.0185(18)	0.0260(18)	-0.0018(14)	0.0043(14)	-0.0032(14)
C9	0.0108(14)	0.0292(18)	0.0178(16)	0.0021(13)	0.0020(12)	0.0034(13)
C10	0.0166(16)	0.040(2)	0.0276(18)	-0.0065(16)	0.0011(13)	-0.0027(15)
C11	0.0230(18)	0.041(2)	0.031(2)	0.0125(17)	0.0065(15)	0.0112(17)
C12	0.0181(17)	0.037(2)	0.0238(17)	-0.0058(15)	0.0017(13)	0.0069(15)
C13	0.0154(15)	0.0150(14)	0.0094(13)	-0.0014(11)	-0.0004(11)	0.0003(12)
C14	0.0151(15)	0.0162(15)	0.0103(13)	-0.0038(11)	-0.0006(11)	-0.0020(12)
C15	0.0166(15)	0.0161(16)	0.0111(14)	-0.0034(11)	0.0003(11)	-0.0013(12)
C16	0.0196(16)	0.0213(17)	0.0115(14)	-0.0039(12)	0.0058(11)	-0.0056(13)
C17	0.0118(15)	0.0206(17)	0.0185(15)	-0.0061(13)	0.0014(11)	0.0001(12)
C18	0.0180(15)	0.0185(18)	0.0147(14)	-0.0025(11)	-0.0012(11)	0.0010(12)
C19	0.0157(15)	0.0156(14)	0.0118(14)	0.0001(11)	-0.0001(11)	-0.0033(12)
C20	0.0083(13)	0.0180(16)	0.0159(14)	0.0019(12)	0.0008(11)	0.0023(12)
C21	0.0094(14)	0.0237(16)	0.0154(15)	-0.0024(13)	0.0004(11)	0.0001(12)
C22	0.0139(15)	0.0326(19)	0.0117(14)	0.0023(13)	0.0000(11)	-0.0020(13)
C23	0.0126(15)	0.0274(18)	0.0203(17)	0.0082(14)	0.0015(12)	-0.0003(13)
C24	0.0115(14)	0.0185(15)	0.0258(17)	0.0016(13)	0.0017(12)	0.0014(13)
C25	0.0144(14)	0.0224(17)	0.0154(14)	-0.0036(13)	0.0038(10)	0.0021(13)
C26	0.0144(15)	0.0181(16)	0.0112(14)	0.0015(11)	-0.0007(11)	-0.0046(12)
C27	0.0165(16)	0.0180(15)	0.0161(15)	0.0005(12)	0.0003(12)	-0.0007(12)
C28	0.0206(17)	0.0266(17)	0.0144(15)	-0.0014(13)	0.0003(12)	-0.0068(14)
C29	0.0167(16)	0.034(2)	0.0192(16)	0.0046(14)	-0.0049(12)	-0.0044(15)
C30	0.0138(15)	0.028(2)	0.0244(17)	0.0023(14)	-0.0001(13)	0.0028(13)
C31	0.0161(15)	0.0284(18)	0.0152(15)	-0.0003(13)	0.0029(12)	0.0009(14)

Table 5. Hydrogen coordinates and isotropic displacement parameters (\AA^2) for SLD361.

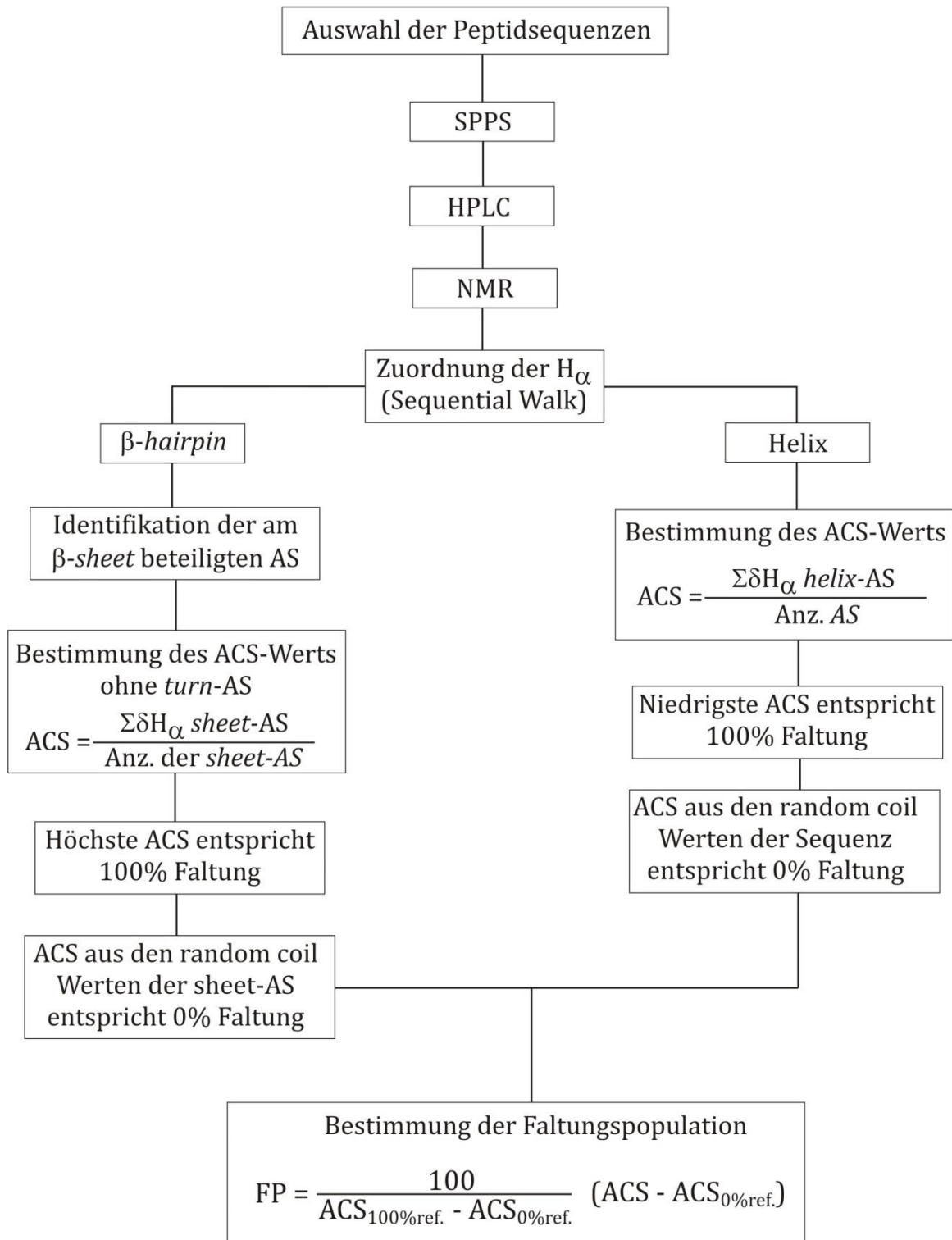
	x	y	z	U(eq)	Occupancy
H2	0.41038	0.44566	0.05750	0.017	1
H4A	0.40947	0.37060	0.30437	0.018	1
H4AB	0.37202	0.57270	0.28189	0.018	1
H5	0.52252	0.62312	0.20392	0.017	1
H6A	0.55574	0.24602	0.19148	0.018	1
H6AB	0.59292	0.39446	0.12448	0.018	1
H8A	0.32988	-0.20224	0.13370	0.037	1
H8AB	0.42603	-0.15892	0.07284	0.037	1
H8AC	0.29426	-0.13218	0.03257	0.037	1
H10A	-0.09646	0.50300	0.15232	0.042	1
H10B	-0.00364	0.37426	0.20714	0.042	1
H10C	-0.00645	0.40270	0.10102	0.042	1
H11A	-0.01992	0.79666	0.08810	0.047	1
H11B	0.06959	0.68036	0.04380	0.047	1
H11C	0.11377	0.83565	0.11283	0.047	1
H12A	-0.02811	0.76451	0.25476	0.039	1
H12B	0.10622	0.80014	0.27657	0.039	1
H12C	0.05348	0.62445	0.31283	0.039	1
H15	0.53935	0.62417	0.48682	0.018	1
H16	0.35652	0.70246	0.50928	0.021	1
H17	0.25045	0.90824	0.41344	0.021	1
H18	0.33116	1.03694	0.29653	0.021	1
H19	0.51793	0.96850	0.27731	0.018	1
H21	0.69987	0.66835	0.18562	0.020	1
H22	0.76756	0.85910	0.08394	0.024	1
H23	0.82794	1.14369	0.12862	0.024	1
H24	0.81752	1.23812	0.27621	0.022	1
H25	0.74684	1.04880	0.37670	0.021	1
H27	0.68163	0.87265	0.52742	0.021	1
H28	0.82392	0.85145	0.65318	0.025	1
H29	0.98311	0.67131	0.64858	0.029	1
H30	1.00422	0.52413	0.51533	0.027	1
H31	0.86347	0.54909	0.38845	0.024	1

Table 6. Torsion angles [°] for SLD361.

C8-O2-C1-O1	2.8(4)	S1-C13-C14-C15	64.1(3)
C8-O2-C1-C2	-171.6(3)	C19-C14-C15-C16	-0.2(4)
C7-N3-C2-C1	-74.7(3)	C13-C14-C15-C16	-174.4(3)
C4-N3-C2-C1	126.5(3)	C14-C15-C16-C17	1.2(5)
C7-N3-C2-C6	165.1(3)	C15-C16-C17-C18	-0.6(5)
C4-N3-C2-C6	6.3(3)	C16-C17-C18-C19	-0.9(5)
O1-C1-C2-N3	153.0(3)	C17-C18-C19-C14	1.8(5)
O2-C1-C2-N3	-32.5(4)	C15-C14-C19-C18	-1.2(4)
O1-C1-C2-C6	-90.1(3)	C13-C14-C19-C18	172.7(3)
O2-C1-C2-C6	84.4(3)	C14-C13-C20-C21	-108.9(3)
C7-N3-C4-C5	-137.8(3)	C26-C13-C20-C21	124.4(3)
C2-N3-C4-C5	18.8(3)	S1-C13-C20-C21	10.8(4)
N3-C4-C5-C6	-36.2(3)	C14-C13-C20-C25	70.0(3)
N3-C4-C5-S1	-155.5(2)	C26-C13-C20-C25	-56.7(3)
C13-S1-C5-C6	148.3(2)	S1-C13-C20-C25	-170.3(2)
C13-S1-C5-C4	-95.9(3)	C25-C20-C21-C22	-1.4(4)
C4-C5-C6-C2	40.7(3)	C13-C20-C21-C22	177.5(3)
S1-C5-C6-C2	164.8(2)	C20-C21-C22-C23	1.2(5)
N3-C2-C6-C5	-28.8(3)	C21-C22-C23-C24	-0.4(5)
C1-C2-C6-C5	-153.8(2)	C22-C23-C24-C25	-0.2(5)
C9-O4-C7-O3	-1.6(5)	C23-C24-C25-C20	0.0(5)
C9-O4-C7-N3	178.3(3)	C21-C20-C25-C24	0.8(4)
C2-N3-C7-O3	15.8(5)	C13-C20-C25-C24	-178.2(3)
C4-N3-C7-O3	171.4(3)	C14-C13-C26-C27	-20.1(4)
C2-N3-C7-O4	-164.1(3)	C20-C13-C26-C27	105.5(3)
C4-N3-C7-O4	-8.5(4)	S1-C13-C26-C27	-135.1(3)
C7-O4-C9-C10	65.0(3)	C14-C13-C26-C31	163.1(3)
C7-O4-C9-C12	-176.9(3)	C20-C13-C26-C31	-71.3(4)
C7-O4-C9-C11	-59.6(4)	S1-C13-C26-C31	48.1(3)
C5-S1-C13-C14	52.0(2)	C31-C26-C27-C28	-2.1(5)
C5-S1-C13-C26	172.71(19)	C13-C26-C27-C28	-179.0(3)
C5-S1-C13-C20	-71.3(2)	C26-C27-C28-C29	-0.1(5)
C26-C13-C14-C19	136.6(3)	C27-C28-C29-C30	1.9(5)
C20-C13-C14-C19	13.6(4)	C28-C29-C30-C31	-1.3(5)
S1-C13-C14-C19	-109.8(3)	C29-C30-C31-C26	-1.1(5)
C26-C13-C14-C15	-49.5(4)	C27-C26-C31-C30	2.8(5)
C20-C13-C14-C15	-172.6(3)	C13-C26-C31-C30	179.7(3)

Symmetry transformations

Bestimmung der Faltungspopulation von Sekundärstrukturen



9. Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Promotion begleitet und zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen haben.

Prof. Dr. ERIC MEGGERS danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. ANDREAS SEUBERT danke ich für die Bereitschaft, der Prüfungskommission anzugehören.

Den Mitarbeitern der massenspektrometrischen Abteilung, insbesondere Dr. UWE LINNE und JAN BAMBERGER, danke ich für die Aufnahme der Massenspektren.

Den Mitarbeitern der NMR-Abteilung, Dr. XIULIAN XIE, Dr. RONALD WAGNER, GERT HÄDE und CORNELIA MISCHKE, danke ich für die vielen Messungen an den Hochfeldspektrometern.

Der wahren Chefin der Arbeitsgruppe, SUANNE SCHELLENBERG, danke ich besonders für ihre Geduld beim Erstellen von Kostenvoranschlägen und allen anderen organisatorischen Aufgaben sowie für die vielen Gespräche jenseits der Chemie bei den morgendlichen und mittäglichen Tee- und Kaffeerunden.

Dr. CARSTEN AUDEL danke ich für seine Hilfsbereitschaft und die unermüdliche Organisation der OC-Praktika sowie den vielen interessanten Gesprächen und Anekdoten aus vergangenen Tagen oder aktueller Hochschulpolitik. Besonders möchte ich mich jedoch für die Möglichkeit einer aktiveren Beteiligung in der Lehre durch das Halten des Syntheseminars bedanken.

Guaat! Ich danke Dr. ANDREAS SCHRIMPF, dem wirklich größten Prog-Liebhaber, nicht nur in körperlicher Hinsicht, für die gemeinsame Zeit in unserem Auswertebereich und der Pflege des Zen-Gartens. Danke für die vielen Gespräche draußen auf der Bank über alle erdenklichen Themen jenseits der Chemie und dem gemeinsamen Genuss guter Musik, ob live in Aschaffenburg oder über die kleinen Stereolautsprecher aus dem Vermächtnis von Christoph Klotz. Ich hoffe wir treffen uns mal auf ein Glas Bier im Dorfbräuhaus in Landenhausen.

Dr. MARYNA ABACILLAR danke ich für ihre herzliche und fürsorgliche Art sowie der Versorgung mit Schokolade und den essbaren Gardinenringen aus den Tiefen der Ukraine.

Dr. ANDRÉ WUTTKE danke ich für die gut organisierte gemeinsame Zeit in unserem Labor auf A6 und seiner ehrlichen Art, die besonders beim Referieren über die P****wissenschaften zu Tage tritt. Zum Glück bleibt deine unverwechselbare Frohnatur in abgelichteter Form als Vermächtnis im Arbeitskreis.

Besonders bedanke ich mich bei Dr. MATTHIAS KÖRLING, ohne dessen Engagement im Arbeitskreis vieles nicht so reibungslos abgelaufen wäre, für die langjährige Freundschaft und die vielen gemeinsamen Reisen, ob im nahen Allgäu für ein Winterbiwak oder auf *Kulnatour* im fernen Usbekistan und Kirgistan. Danke auch für die vielen Gespräche wissenschaftlicher und weltlicher Natur, die manchmal nach den gemeinsamen Bouldersessions bis spät in die Nacht gegangen sind. Und ja, auch ich habe dank deiner Einführung in das weite Feld der Foldone letztendlich meinen Frieden mit ihnen geschlossen.

Mmmhm, im Büro (?) Ich danke Dr. JAN REUTZEL, der molekulare Bretter wie kein zweiter synthetisieren kann, für den täglichen Austausch über mögliche Reiseziele und die gemeinsame Tour nach Marokko. Danke für die Bearbeitung der Geheimforschung und dem Ausdrucken der wirklich wichtigen Dokumente und Fotos. Ohne deine *memes* wäre das Herrenklo bis heute noch nicht repariert.

Dr. ROMINA KIRSCHNER danke ich für kulinarische Versorgung, ob in gebackener oder gekochter Form und den regelmäßigen Austausch über zukünftige oder bereits bereiste Reiseziele.

Meinem Vorgänger im Wasserbusiness, DR. MATTHIAS LAMPING, danke ich für seine freundliche und unkomplizierte Art und das gemeinsame durchstehen der Tage mit dem Energiebündel Giorgio Marrini beim Aufau des Synthi.

MAXIMILIAN JUNG, dem Koch der besten Bolognese ever, danke ich für seine herzliche und überaus hilfsbereite Art sowie den vielen durchzechten Abende in der Oberstadt oder am Fachbereich. Lass dich von den Tachiplesinen nicht ärgern aber du hast ja auch noch zwei Jahre um sie zu bändigen.

Ich danke MATHIS RINK, JOHANNES MARTIN, NICHOLAS RAU und THORSTEN LEDER für die tolle gemeinsame Zeit während des Studiums und darüber hinaus. Danke für die vielen Abende jenseits des Fachbereichs, ob im Blitzweg oder in unserem zweiten Wohnzimmer, dem Pegasus. Es war mir ein inneres Perlentauchen!

Der Wassermann ist da! Meinem Nachfolger in der Versorgung des Arbeitskreises mit Kaltgetränken und amtierende Herrscher über die Silaffine, FABIAN DAUS, danke ich für seine unerschütterliche Art mit beratungsresistenten Praktikanten umzugehen und die vielen chemischen und nicht chemischen Gespräche. Auch wenn deine Forschung in der molekularen Bionik viel zu straightforward ist, wünsche ich dir weiterhin viel Erfolg (natürlich auch im privaten mit der Glücksfee).

LENNART NICKE, dem Bezwingen der Diastereomere, danke ich für die lebenswichtige Versorgung des Arbeitskreises mit Kaffee und dem ein oder andern Kasten Kölsch. Ich wünsche dir in den letzten Monaten deiner Promotion noch viel Erfolg und das die π -Systeme sich im Peptid finden.

CHRISTOPH PRIEM danke ich für die vielen fachlichen Gespräche und auch denen mit Themen jenseits der Chemie. Ich hoffe dass du niemals eine Allergie auf Milchprodukte entwickelst, da sonst dein Rekordversuch für den längsten konstanten Magerquakkonsum ernsthaft in Gefahr geraten könnte.

Ich danke dem AK42, CHRISTIAN HEINRICH MÜLLER, CHRISTOPHER BERND PFAFF und FABIAN FISCHER, für die vielen Gemeinsamen Stunden in der Spelunke, der gemeinsamen Leidenschaft für Whisky und den gemeinsamen Ausflügen nach Damshausen zum Schnitzel essen oder den legendären Poolpartys. Danke für die schöne Zeit am Fachbereich. Ohne euch wäre es keine richtige Promotion gewesen.

MICHELLE KRÜGER danke ich für die gute Laune und das unverwechselbare Lachen (oder ist es mehr ein ersticken) sowie für die äußerst unterhaltsamen Geschichten aus deinem scheinbar „normalen Alltag“. Bleib wie du bist obwohl wahrscheinlich noch ein paar Tatoos hinzukommen werden.

Steffen Müller danke ich für seine erheiternde Art und die grandiosen Tanzperformances auf diversen Feiern am Fachbereich.

Ich danke MICHAEL MÜLLER für das zubereiten exquisiter Salate und das anschließende abbauen der Kalorien beim Schwimmen im AquaMar, was leider viel zu selten geklappt hat.

Meinem ersten Bachelor und späteren Vertiefer TIMO v. KEUTZ danke ich für seine Hilfsbereitschaft die den gesamten Arbeitskreis bereichert hat und den fast wöchentlichen Kuchen. Danke auch für die dem ein oder anderen Abend im Molly Malone's bei einer Runde

Darts. Allerdings müsste das KOH-Bad mal wieder ausgeräumt werden. Das gibt natürlich Punktabzug.

DENNIS KLEE danke ich für seine ruhige, besonnene Art und die gemeinsamen Abende in der Spelunke. Ich hoffe du weißt, dass du der letzte deiner Art sein wirst aber dennoch wünsche ich dir viel Erfolg und einen guten Start in deine Promotion.

PHILIP HORX danke ich für das zappeln lassen der Moleküle und den herausragenden humoristischen Imitationen einiger ausgewählter Persönlichkeiten aus dem universitären Umfeld. Da es auf dem Gebiet des molekularen Modellings nichts Neues mehr geben wird wünsche ich dir mal lieber viel Erfolg mit den Zinkfingern, da könnte man mal ein Manuskript schreiben....

Meinen Vertiefern und Bachelor-Studenten, GRETA LINDEN, ANDREAS HERDLITSCHKA, MARK PAUL FISCHER, MIKE POHL, ANDRÉ SCHMIEGEL, TIMO V. KEUTZ, danke ich für ihre aufgebrachte Motivation und das Umsetzen meiner teilweise auch etwas zu ambitionierten Ideen. Ohne euch wäre ein erheblicher Teil dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Ein besonderes Dankeschön geht an ANNA, für die wunderschöne gemeinsame Zeit die wir bis jetzt hatten und hoffentlich auch in Zukunft miteinander verbringen werden. Danke, dass du mich immer unterstützt und mich auch in den manchmal schwierigen Phasen ausgehalten hast.

Allen derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern des Arbeitskreises GEYER möchte ich für die schönen gemeinsamen Jahre auf A6 und später im Neubau danken. Im Besonderen gilt dieser Dank natürlich dem Mitarbeiter mit der höchsten Anwesenheit: *Frank*.

Für das Lesen und korrigieren meiner Doktorarbeit bedanke ich mich bei JAN REUTZEL, PHILIP HORX, CHRISTOPH PRIEM, MARTINA LENZ und ganz besonders ANNA RÖDER und ANDREAS SCHRIMPF.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, die mir immer zur Seite gestanden hat und den nötigen Rückhalt für mein Studium, auch in finanzieller Hinsicht, gegeben hat. Ohne euch wären mein Studium und damit auch diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Erklärung

Ich erkläre, dass eine Promotion noch an keiner anderen Hochschule als der Philipps-Universität Marburg, Fachbereich Chemie, versucht wurde.

Hiermit versichere ich, dass die von mir vorgelegte Dissertation:

„Succinimid-Thioether in der Peptidligation – Methodenentwicklung und Strukturaufklärung“

selbst und ohne fremde Hilfe verfasst, nicht andere als die in ihr angegebenen Quellen oder Hilfsmittel benutzt, alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet sowie die Dissertation in der vorliegenden oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen in- oder ausländischen Hochschule anlässlich eines Promotionsgesuchs oder zu anderen Prüfungszwecken eingereicht habe.

Marburg, 30.05.2018

Stefan Lenz